

Die Funktion der HRD-Ubiquitinligase bei der Protein-Dislokation aus dem Endoplasmatischen Retikulum

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biochemiker Martin Mehnert

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Sommer
2. Prof. Dr. Udo Heinemann
3. Prof. Dr. Thorsten Hoppe

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
1 Einleitung	1
1.1 Die zelluläre Protein-Qualitätskontrolle.....	1
1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	2
1.2.1 Die Ubiquitinierung von Proteinen.....	2
1.2.2 Die Funktion der AAA-ATPase Cdc48 im Ubiquitin-Proteasom-System	3
1.2.3 Das 26S Proteasom	4
1.3 Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteindegradation (ERAD)	5
1.3.1 Die Ubiquitinligasen des ERAD-Systems.....	5
1.3.2 Die Erkennung fehl- und ungefalteter Proteine im ER	7
1.4 Die <i>unfolded protein response</i> - ein adaptiver Mechanismus der Protein-Qualitätskontrolle am ER	7
1.5 Die Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER	8
1.5.1 Generelle Aspekte des Exportprozesses von ERAD-Substraten	8
1.5.2 Die Rolle des Sec61-Translokons beim Substratexport	10
1.5.3 Der1/Derlins als Komponenten des Exportkanals.....	11
1.5.4 ERAD-Ubiquitinligasen als Komponenten des Exportkanals.....	12
1.5.5 <i>Lipid Droplets</i> als Alternative zu einem Kanal-basierten Transportsystem.....	13
1.5.6 Die Rolle der AAA-ATPase Cdc48 bei der Protein-Dislokation	15
1.5.7 Das Importsystem der Peroxisomen als Modell für den Exportprozess am ER	15
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Enzyme	18
2.1.3 Größenstandards	18
2.1.4 Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme	18
2.1.5 Geräte und sonstige Materialien	18

2.1.6	Bakterienstämme.....	19
2.1.7	Hefestämme	19
2.1.8	Plasmide	23
2.1.9	Oligonukleotide	24
2.1.10	Antikörper	29
2.1.10.1	Primäre Antikörper.....	29
2.1.10.2	Sekundäre Antikörper	30
2.1.11	verwendete Puffer und Medien.....	30
2.1.11.1	Medien für Bakterienkulturen.....	30
2.1.11.2	Medien für Hefekulturen	31
2.1.11.3	Puffer und Lösungen für molekular- und zellbiologische Methoden	31
2.1.11.4	Puffer und Lösungen für biochemische Methoden	32
2.2	Methoden	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen	35
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.3	Punktmutagenese von DNA-Sequenzen.....	36
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.2.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.2.1.6	Restriktionsverdau	36
2.2.1.7	Transformation von <i>E. coli</i>	37
2.2.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.2.1.9	Sicherung von PCR-Fragmenten	38
2.2.1.10	Allgemeine Klonierungsstrategie	38
2.2.1.11	DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.2	Biochemische Methoden	39
2.2.2.1	Gesamtzellaufschluss.....	39
2.2.2.2	Isolierung von Membranen aus Hefezellen	39
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.2.4	Immunoblot (<i>Western-Blotting</i>).....	40
2.2.2.5	Größenanalyse des Der1-Oligomers mittels Gelfiltration	41
2.2.2.6	Nicht-denaturierende Immunopräzipitation (Ko-IP)	41
2.2.2.7	Isolierung polyubiquitinerter Substrate aus Gesamtzellextrakt	42
2.2.2.8	Detektion membranassoziierter polyubiquitinerter Substrate	43
2.2.3	Zellbiologische Methoden	44
2.2.3.1	Kultivierung von Hefezellen	44
2.2.3.2	Messung der optischen Dichte von Hefezellen	44
2.2.3.3	Sporulation und Tetradendisektion	44
2.2.3.4	Transformation von Hefezellen.....	45
2.2.3.5	Manipulation von Gensequenzen in Hefezellen	45

2.2.3.6	Cycloheximid-Abbau-Experiment.....	46
2.2.3.7	<i>Pulse Chase</i> -Experiment	47
2.2.3.8	Proteinase K-Sensitivitätstest zur Untersuchung des Exports von ERAD-Substraten in das Zytosol.....	48
2.2.3.9	Zielgerichtetes <i>in vivo photocrosslinking</i> von Der1	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Die Stabilität von Der1 in der HRD-Ligase.....	51
3.1.1	Der1 wird in Abwesenheit von Usa1 instabil und über Ubiquitinligasen des ERAD-Systems abgebaut.....	51
3.1.2	Der1 wird durch die Bindung an den Usa1 C-Terminus stabilisiert	52
3.2	Charakterisierung der Der1-Usa1-Interaktion	53
3.2.1	Die Modifizierung des N-Terminus reduziert die Proteinmenge von Der1.....	53
3.2.2	Die Deletion des Der1 C-Terminus führt zum Verlust der Usa1-Interaktion	54
3.2.3	Das C-terminale GHxxYY-Motiv ist an der Interaktion zu Usa1 beteiligt	55
3.2.4	Die Fusion des Der1 C-Terminus an das Der1-Homolog Dfm1 ermöglicht eine direkte Interaktion des Fusionsproteins mit Usa1	57
3.3	Charakterisierung der Der1-Oligomerisierung.....	58
3.3.1	Der1 bildet Oligomere	58
3.3.2	Usa1 vermittelt die Der1-Oligomerisierung	60
3.3.3	Der1-Varianten mit verkürztem C-Terminus oder Mutationen im C-terminalen Usa1-Interaktionsmotiv können keine Oligomere bilden.....	63
3.3.4	Usa1 oligomerisiert unabhängig von Der1 und Hrd1	64
3.3.5	Die Usa1-Selbstoligomerisierung induziert die Oligomerbildung von Hrd1 und Der1	66
3.3.6	Die Hochregulierung des Der1-Expressionslevels durch UPR-Induktion ermöglicht eine Usa1-unabhängige Selbstoligomerisierung von Der1	68
3.3.7	Die Oligomerisierung der HRD-Ligase ist nicht notwendig für den Abbau des luminalen ERAD-Substrats CPY*	70
3.3.8	Ein Hrd1-Usa1C-Fusionsprotein kann den CPY*-Abbaufekt in $\Delta usa1$ -Zellen nicht komplementieren	72
3.4	Einordnung von Der1 in die Abbaukaskade der HRD-Ligase	74
3.5	Mutagenese der Der1 Transmembrandomänen.....	76
3.5.1	Zielgerichtete Punktmutagenese von Der1	76
3.5.2	Die Mutation der Der1 TM-Domänen inhibiert spezifisch den Abbau löslicher ERAD-Substrate.....	79

3.5.3	Die Stabilität und Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase wird nicht durch die Mutationen in den TM-Domänen beeinflusst.....	80
3.5.4	Die Der1 TM-Mutanten blockieren den Export von CPY* aus dem ER-Lumen in das Zytosol	82
3.5.5	Die Expression der Der1 TM-Mutanten führt zu einer reduzierten Ubiquitinierung von CPY*	83
3.6	Zielgerichtetes <i>in vivo</i> photocrosslinking von Der1.....	85
3.6.1	Markierung bestimmter Positionen von Der1 mit dem <i>Crosslinker</i> p-Benzoyl-L-Phenylalanin	85
3.6.2	Stabilität, Funktionalität und Assoziation der pBpa-markierten Der1-Varianten mit der HRD-Ligase	87
3.6.3	Der1 bildet Quervernetzungen zum ERAD-Substrat CPY* und zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase aus.....	89
3.6.4	Die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase über Usa1 ist für die Ausbildung der <i>Crosslinking</i> -Reaktionen zu Hrd1 und Hrd3 notwendig.....	92
3.6.5	Die erste luminal Schleife von Der1 bildet Quervernetzungen zur luminalen Domäne von Hrd3 aus.....	93
3.6.6	Der1 bildet unabhängig von der Rekrutierung zur HRD-Ligase Quervernetzungen zum Substrat CPY* aus	94
3.6.7	Mutationen in den TM-Domänen von Der1 beeinflussen die <i>Crosslinking</i> -Reaktionen zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase.....	98
3.6.8	Die Deletion von <i>USA1</i> führt zu einer Reduktion der CPY*-3xHA- <i>Crosslinks</i> in der luminalen Schleife der Der1 (R17LN73L)-Mutante	103
4	Diskussion.....	105
4.1	Integration von Der1 in die HRD-Ligase.....	105
4.1.1	Die Stabilität und Interaktion von Der1 mit der HRD-Ligase wird durch Usa1 vermittelt.....	105
4.1.2	Usa1 vermittelt als Strukturkomponente die Oligomerisierung von Der1	107
4.1.3	Usa1 dient als zentrales Gerüstprotein für die Assemblierung der HRD-Ligase ...	109
4.2	Funktionelle Charakterisierung von Der1	111
4.2.1	Der1 ist an einem der Substratrekrutierung nachgeschalteten Schritt im Abbauprozess beteiligt	111
4.2.2	Mutationen in den TM-Domänen von Der1 blockieren die Dislokation und den Abbau luminaler ERAD-Substrate	111

4.3	Einblick in die Topologie der HRD-Ligase durch zielgerichtetes	
	<i>in vivo photocrosslinking</i> von Der1	113
4.3.1	Die TM-Domänen von Der1 sind mit Hrd1 assoziiert und könnten ein Teil des Exportkanals darstellen	113
4.3.2	Der1 ist auf der luminalen Seite mit dem Substratrezeptor Hrd3 assoziiert	114
4.3.3	Die Der1 TM-Domänen befinden sich in räumlicher Nähe zum Substrat	116
4.3.4	Mutationen in den TM-Domänen beeinflussen die sterische Ausrichtung von Der1 zur HRD-Ligase	116
4.4	Ein Modell zur Funktion von Der1 beim Abbau luminaler	
	ERAD-Substrate	117
	Literaturverzeichnis.....	119
	Anhang A PCR-Programme	126
A.1	Programm für Amplifikationen mit dem <i>Expand High Fidelity PCR System/</i> Taq DNA-Polymerase	126
A.2	Programm für Amplifikationen mit der <i>Pfu Ultra™ HF</i> DNA-Polymerase	126
	Anhang B PCR-Ansätze	127
	Abkürzungsverzeichnis A Akronyme/Einheiten	128
	Abkürzungsverzeichnis B Aminosäurecode.....	131
	Publikationen	132
	Selbständigkeitserklärung.....	133
	Danksagung	134

Zusammenfassung

Fehlgefaltete Proteine des sekretorischen Weges werden aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytosol transportiert und dort durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Dieser Qualitätskontrollmechanismus wird als Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteindegradation bezeichnet (ERAD). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt die HRD-Ubiquitinligase eine zentrale Komponente dieses Abbausystems dar. Eine Untereinheit dieses Multienzymkomplexes ist das ER-ständige Membranprotein Der1, das über die Untereinheit Usa1 an die Ubiquitinligase Hrd1 rekrutiert wird und ausschließlich für den Abbau löslicher luminaler ERAD-Substrate notwendig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse über die Integration von Der1 in die HRD-Ligase und die funktionelle Bedeutung des Proteins beim Abbauprozess gewonnen werden. So vermittelt ein konserviertes Motiv im C-Terminus von Der1 die Interaktion zu Usa1 und damit die Rekrutierung des Proteins zur HRD-Ligase. Usa1 ist hierbei nicht nur ein wichtiges Bindeglied zwischen Der1 und Hrd1. Es induziert auch die Oligomerisierung der beiden Komponenten und wirkt daher als zentrales Gerüstprotein der HRD-Ligase. Punktmutationen in den Transmembrandomänen von Der1 beeinträchtigen die Dislokation luminaler Substratproteine aus dem ER. Um weitere Hinweise für eine Beteiligung von Der1 beim Substrattransport zu erhalten, wurde die Methode des zielgerichteten *in vivo photocrosslinking* für Der1 angewendet. Hierbei wurden bestimmte Positionen von Der1 mit dem photoreaktiven Aminosäureanalogon p-Benzoyl-L-Phenylalanin markiert, was die Ausbildung von Quervernetzungen von Der1 zu Interaktionspartnern nach einer UV-Bestrahlung ermöglichte. Schließlich konnte mittels *in vivo photocrosslinking* eine räumliche Nähe der luminal exponierten Bereiche von Der1 zum Substratrezeptor Hrd3 gezeigt werden, während die Transmembransegmente Quervernetzungen zu Hrd1 ausbildeten. Beide Bereiche von Der1 konnten zudem mit einem luminalen ERAD-Substrat quervernetzt werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde somit erstmals eine direkte Beteiligung von Der1 insbesondere in den ersten Schritten der Substratdislokation gezeigt, was eine Funktion von Der1 als zentrale Komponente des Exportkomplexes nahelegt.

Schlagwörter: ERAD, UPS, sekretorische Proteine, Protein-Dislokation, HRD-Ubiquitinligase

Abstract

Newly synthesized proteins of the secretory pathway are subjected to an efficient quality control system in the endoplasmic reticulum. In order to prevent a harmful aggregation misfolded proteins are exported via a largely unknown mechanism into the cytosol and degraded by the ubiquitin-proteasome system in a process termed ER associated degradation (ERAD). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the HRD-ligase constitutes a central component of ERAD. A subunit of this multi-enzyme complex is the small multispanning membrane protein Der1, which is exclusively required for the degradation of misfolded ER luminal proteins but dispensable for the turnover of membrane-bound substrates.

In this study a short conserved motif in the cytosolic carboxyterminus of Der1 was identified that mediates the binding to the HRD-ligase. Moreover, co-immunoprecipitation experiments show that Der1 forms oligomers, which relies on its assembly into the degradation complex. Mutations in the transmembrane domains of Der1 block the export of soluble proteins across the ER-membrane. To further investigate the function of Der1 in substrate dislocation an *in vivo* site-specific photocrosslinking approach was applied. Various positions of Der1 were labelled with the photoreactive amino acid analogue p-benzoyl-phenylalanine followed by UV irradiation of living cells expressing these Der1 constructs. The crosslinking experiments reveal a spatial proximity of ER luminal exposed parts of Der1 to the substrate receptor Hrd3. By contrast, the membrane-embedded domains of Der1 reside adjacent to the ubiquitin ligase Hrd1. Intriguingly, both regions also form crosslinks to a client protein. In summary the data of this work imply that multimeric Der1 initiates the export of aberrant polypeptides from the ER-lumen by threading such molecules into the ER-membrane and routing them to Hrd1 for ubiquitylation.

Keywords: ERAD, UPS, secretory proteins, protein dislocation, HRD-ubiquitin ligase

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Protein-Qualitätskontrolle

Proteine sind in der Zelle zahlreichen Stressfaktoren ausgesetzt, die die Struktur des Proteins beeinflussen. Oxidativer Stress, reaktive Nebenprodukte des Stoffwechsels, hochenergetische Strahlung, ein vorzeitiger Abbruch der Proteinsynthese oder genetisch codierte Mutationen können Ursachen einer Fehlfaltung von Proteinen sein. Die Anreicherung und Aggregation fehlgefalteter Proteine kann schließlich zu einem Funktionsverlust und Absterben der Zelle führen und somit bei der Entstehung zahlreicher schwerwiegender Erkrankungen wie zystische Fibrose, Krebs, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington beteiligt sein. Aufgrund der Komplexität des Faltungsvorgangs und der Vielzahl an Faktoren, die eine fehlerhafte Faltung verursachen können, stellen Faltungsdefekte kein seltenes Ereignis in der Zelle dar. Daher weisen Zellen verschiedene Strategien der Protein-Qualitätskontrolle auf, um der Fehlfaltung von Proteinen und deren Folgen entgegenzuwirken. Eine Maßnahme stellt die Neufaltung von Proteinen durch molekulare Chaperone dar. Exponierte hydrophobe Bereiche, die für eine Proteinefehlfaltung charakteristisch sind, werden durch Chaperone erkannt und gebunden. Chaperone der Hsp100-Familie sind außerdem in der Lage, Proteine unter ATP-Verbrauch zu entfalten, so dass anschließend eine Neufaltung des Proteins mithilfe des Hsp70-Chaperons erfolgen kann [1,2]. Eine weitere Strategie der Protein-Qualitätskontrolle ist der Abbau von fehlgefalteten Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System oder durch Autophagozytose. Auch hierbei spielen Chaperone eine zentrale Rolle, indem sie nach einer missglückten Neufaltung dem Ubiquitin-Proteasom-System die fehlgefalteten Proteine zuführen. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen diesen beiden Abbausystemen besteht in der Substratspezifität. Während das Ubiquitin-Proteasom-System spezifisch den Abbau einzelner Proteine induziert (Abschn. 1.2), werden über die Autophagozytose vorwiegend ganze Proteinkomplexe und -aggregate aber auch schadhafte Organellen abgebaut. Die abzubauenden Objekte werden im Zytosol von einer Doppelmembran umschlossen, so dass intrazelluläre Vesikel entstehen, die als Autophagosomen bezeichnet werden. Der proteolytische Abbau des Vesikelinhalts erfolgt durch eine Fusion der Autophagosomen mit dem Lysosom, welches ein separates membranumschlossenes Zellkompartiment darstellt, in dem sich hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Nukleasen befinden.

1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

1.2.1 Die Ubiquitinierung von Proteinen

Der größte Teil der fehlgefalteten Proteine wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UP-System) abgebaut. Eine Voraussetzung für den Abbau über das UP-System ist die posttranslationale Modifizierung des Proteins mit dem Polypeptid Ubiquitin, das aus 76 Aminosäuren besteht und in allen Eukaryoten hoch konserviert ist. Mithilfe einer Enzymkaskade wird ein Ubiquitinmolekül über eine Isopeptidbindung kovalent an das Zielprotein gebunden (Abb. 1.1). Im ersten Schritt der Ubiquitinierung bildet die Thiolgruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum eines Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) unter ATP-Verbrauch eine Thioesterbindung mit der freien Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins des Ubiquitinmoleküls aus. Die Thioesterbindung wird dann auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen, welches mit einer Ubiquitinligase (E3) interagiert. Die Ubiquitinligase vermittelt den Transfer des Ubiquitinmoleküls vom E2-Enzym auf das Zielprotein, indem es die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitinmoleküls katalysiert. Ubiquitinligasen lassen sich in die Gruppe der RING (*Really Interesting New Gene 1*)-Ubiquitinligasen und der HECT (*Homologous to E6AP Carboxy-Terminus*)-Ubiquitinligasen unterteilen [3]. RING-Ubiquitinligasen enthalten eine RING-Finger-Domäne, die mit zwei Zink-Ionen komplexiert ist und durch die Induktion einer bestimmten Ausrichtung des E2-Enzyms zum Zielprotein die Ubiquitinierungsreaktion katalysiert. HECT-Ubiquitinligasen hingegen bilden mit dem Ubiquitinmolekül eine Thioesterbindung aus, bevor das Ubiquitin auf das Zielprotein übertragen wird. Auch das konjugierte Ubiquitin kann nun über interne Lysinreste mit einem weiteren Ubiquitinmolekül verknüpft werden, so dass eine Ubiquitinkette entsteht. Die Länge der Ubiquitinkette und die Position des für die Ubiquitin-Ubiquitin-Konjugation verwendeten Lysins bestimmen die funktionelle Bedeutung der Modifikation für das Zielprotein [4,5]. So leitet die Polyubiquitinierung durch eine Konjugation der Lysin 48-Reste den proteasomalen Abbau des Proteins ein. Das UP-System zeichnet sich hierbei durch eine hohe Substratspezifität aus. Diese wird im Fall von fehlgefalteten Proteinen zum einen durch die Assoziation des Ubiquitinsystems mit Chaperonen gewährleistet. Die Ubiquitinligase CHIP wechselwirkt beispielsweise mit dem Chaperon Hsp70, welches fehlgefaltete Proteine bindet und somit eine effiziente Rekrutierung von Substraten ermöglicht [6]. Zum anderen ist das System in der Lage, durch eine hohe Anzahl verschiedener E3-Ligasen selektiv bestimmte Proteine in der Zelle zu ubiquitinieren.

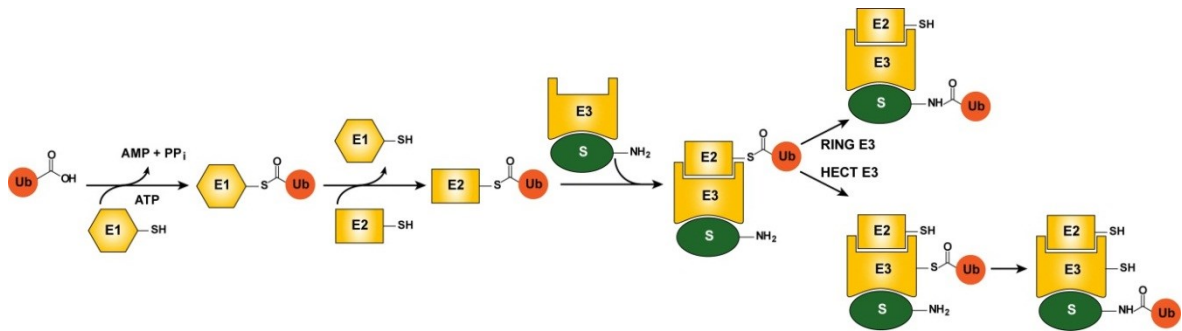


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungsreaktion von Proteinen. Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) bildet unter ATP-Verbrauch mit der freien C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins (Ub) eine Thioesterbindung aus. Anschließend wird das Ubiquitinmolekül auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Durch eine Wechselwirkung mit dem E2-Enzym katalysiert eine Ubiquitinligase (E3) die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem Ubiquitinmolekül und dem Substrat (S). HECT-Ubiquitinligasen gehen hierbei zunächst selber eine Thioesterbindung mit dem Ubiquitin ein. Modifiziert nach [4].

1.2.2 Die Funktion der AAA-ATPase Cdc48 im Ubiquitin-Proteasom-System

Die Ubiquitinierung von Proteinen ermöglicht eine Interaktion mit verschiedenen zellulären Faktoren wie z.B. der hochkonservierten AAA-ATPase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Cdc48 (in Säugerzellen p97/VCP), die eine zentrale Rolle im UP-System spielt. Cdc48 bildet einen homohexameren Komplex aus, der in diversen Ubiquitin-abhängigen Prozessen wie der DNA-Reparatur, Membranfusion, Autophagozytose, Zellteilung und schließlich dem Abbau von Proteinen über das UP-System beteiligt ist [7]. Die zelluläre Funktion des Cdc48-Komplexes wird durch die Wechselwirkung mit bestimmten regulatorischen und enzymatischen Ko-Faktoren bestimmt. Diese binden vorwiegend an den N-Terminus eines Cdc48-Monomers und weisen als Interaktionsdomäne eine SHP-Box, UBX-, VBM- oder VIM-Domäne auf. Ko-Faktoren mit einer PUL- oder PUB-Domäne binden dagegen an den C-Terminus [8]. Die Cdc48-Monomere sind ringförmig um eine zentrale Pore angeordnet, so dass die beiden ATPase-Domänen (D1 und D2) eines Monomers in dem Komplex übereinanderliegen. Die ATP-Hydrolyse führt zu einer räumlichen Verschiebung der ATPase-Domänen, was eine Konformationsänderung des gesamten Cdc48-Komplexes bewirkt [9]. Diese kann sich letztlich auch auf interagierende Proteine bzw. Substrate übertragen [10]. Cdc48 bindet selbst oder über assoziierte Ko-Faktoren an ubiquitinierte Proteine. Unter ATP-Hydrolyse induziert Cdc48 die Freisetzung der gebundenen Substrate aus Proteinkomplexen, Chromatinstrukturen oder von der Membran, um anschließend den proteasomalen Abbau der ubiquitinierten Proteine zu ermöglichen [11,12]. Cdc48 übt somit eine sogenannte „Segregase“-Funktion im UP-System aus. Die Übertragung der Substrate von Cdc48 auf das 26S Proteasom erfolgt wahrscheinlich über die Ubiquitin-

bindenden Faktoren Rad23 und Dsk2 [13,14], die ebenfalls mit Cdc48 assoziiert sind. Rad23 weist eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (UBL) auf, die die Bindung zum 26S Proteasom vermittelt. Da das 26S Proteasom Ubiquitin-bindende Untereinheiten enthält, ist allerdings auch eine Cdc48-unabhängige Rekrutierung von Substraten zum Proteasom möglich (Abschn. 1.2.3).

1.2.3 Das 26S Proteasom

Der proteolytische Abbau von K48-verknüpften polyubiquitinierten Proteinen erfolgt im 26S Proteasom, einem großen Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von 2,5 MDa. Das 26S Proteasom setzt sich aus einem katalytischen 20S-Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S-Komplexen (*cap*) zusammen. Der 20S-Kernkomplex besteht aus vier heteroheptameren Ringen, die aufeinandergestapelt eine fassförmige Struktur ergeben. Während die α -Untereinheiten der beiden äußeren Ringe strukturelle Funktionen einnehmen, befindet sich in dem inneren Ringpaar, das aus β -Untereinheiten aufgebaut ist, die Protease-Aktivität des Komplexes. Dabei bilden die β 1-, β 2- und β 5-Untereinheit unabhängige katalytische Zentren mit einer Caspase-, Trypsin- bzw. Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität aus, die die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen von Substraten katalysieren [15]. Die katalytischen Zentren der Untereinheiten sind in das Innere der Fassstruktur gerichtet, um die zytosolische Umgebung von der Protease-Aktivität abzuschirmen und unspezifische Abbauprozesse zu verhindern. Die fassförmige Struktur des 20S-Kernkomplexes wird an beiden Enden durch den regulatorischen 19S-Komplex (*cap*) abgeschlossen. Dieser setzt sich aus einer ringförmigen Basis (*base*) und einem Deckel (*lid*) zusammen. Ubiquitin-bindende Proteine (Rpn-Untereinheiten) des Deckels binden vorzugsweise K48-polyubiquitinierte Proteine und rekrutieren dadurch spezifisch Substrate zum Proteasom [5]. Durch deubiquitinierende Enzyme werden die Ubiquitin-Konjugate des Substrats nach der Bindung an das Proteasom hydrolytisch abgespalten. Der Basis-Komplex besteht unter anderem aus sechs verschiedenen AAA-ATPasen (Rpt1-6), die unter ATP-Verbrauch rekrutierte Substrate entfalten und anschließend in den proteolytischen 20S-Kernkomplex einführen.

1.3 Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Protein-degradation (ERAD)

1.3.1 Die Ubiquitinligasen des ERAD-Systems

Ungefähr 30 % der synthetisierten Proteine gelangen über den sekretorischen Weg an ihren Bestimmungsort. Die Proteine des sekretorischen Weges werden zunächst an den Ribosomen synthetisiert und dann ko- oder posttranslational in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. Das oxidierende Milieu des ER-Lumens ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken und unterstützt dadurch die Faltung des Proteins. Auch Chaperone des ER-Lumens wie BiP (in *S. cerevisiae* Kar2) und Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) sind beim Erlangen der nativen Proteinstruktur behilflich. Weiterhin kann es zu posttranslationalen Modifikationen des Proteins, wie z.B. einer N-Glykosylierung, im ER-Lumen kommen. Nach einer erfolgreichen Faltung wird das Protein über Vesikel in den Golgi-Apparat transportiert, wo weitere posttranslationale Modifikationen durchgeführt werden. Vom Golgi-Apparat aus gelangt das Protein zum endgültigen Bestimmungsort: ins Lysosom, an die Zellmembran oder in sekretorische Vesikel. Ein Protein-Qualitätskontrollsystem im ER verhindert die Verbreitung und Aggregation fehl- sowie ungefalteter Proteine, indem es diese im ER zunächst zurückhält. Ist nach einer gewissen Zeit die Ausbildung einer nativen Proteinstruktur nicht möglich, erfolgt der Abbau des Proteins. Hierzu werden die fehl- und ungefalteten Proteine im ER-Lumen erkannt und zu einem Abbaukomplex an der ER-Membran rekrutiert. Anschließend werden die Proteine durch die ER-Membran über einen bisher noch unbekannten Mechanismus in das Zytosol transportiert (Dislokation). Dort finden die Polyubiquitinierung und der proteolytische Abbau der Proteine über das UP-System statt. Dieser Qualitätskontrollmechanismus im ER wird zusammenfassend als ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) bezeichnet und ist in allen Organismen hoch konserviert [16]. Zentrale Komponenten dieses Abbausystems in *S. cerevisiae* sind die beiden Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10, die der Gruppe der RING-Finger-Ligasen angehören. Beide Ubiquitinligasen bilden durch die Assoziation mit weiteren Ko-Faktoren jeweils einen Multienzymkomplex aus, der als HRD- bzw. Doa10-Ligase bezeichnet wird (Abb. 1.2). Die enzymatische Kaskade für die Substratubiquitinierung durch Hrd1 setzt sich aus dem E1-Enzym Uba1 und den beiden E2-Enzymen Ubc1 und Ubc7 zusammen [17,18]. Anstelle von Ubc1 ist im Doa10-Ligase-Komplex das E2-Enzym Ubc6 an der Enzymkaskade beteiligt [19-21]. Die beiden Ligase-Komplexe vermitteln den Abbau unterschiedlicher Substratklassen. Fehlgefaltete ER-luminale Proteine (ERAD-L) sowie integrale Membranproteine mit Faltungsdefekten in den Transmembrandomänen (TM-Domänen) (ERAD-M) oder im luminalen Bereich werden über die HRD-Ligase abgebaut. Die Doa10-Ligase ist

hingegen für die Proteolyse von membranständigen Proteinen mit Fehlfaltungen im zytosolischen Bereich (ERAD-C) zuständig [22]. Neuen Erkenntnissen zufolge sind auch Rhomboid-Proteasen mit dem ERAD-System assoziiert und beim Abbau membranständiger ERAD-Substrate beteiligt [23]. Aufgrund der Lage des aktiven Zentrums können Rhomboid-Proteasen Membranproteine innerhalb einer TM-Domäne proteolytisch spalten. Neben den Homologen zu Hrd1 und Doa10 besteht das ERAD-System in Säugerzellen noch aus weiteren Ubiquitinligasen, die bisher allerdings nur unzureichend charakterisiert sind [24]. Es wird vermutet, dass sich das System auf diese Weise der Vielzahl unterschiedlicher Substrate in Säugerzellen anpasst.

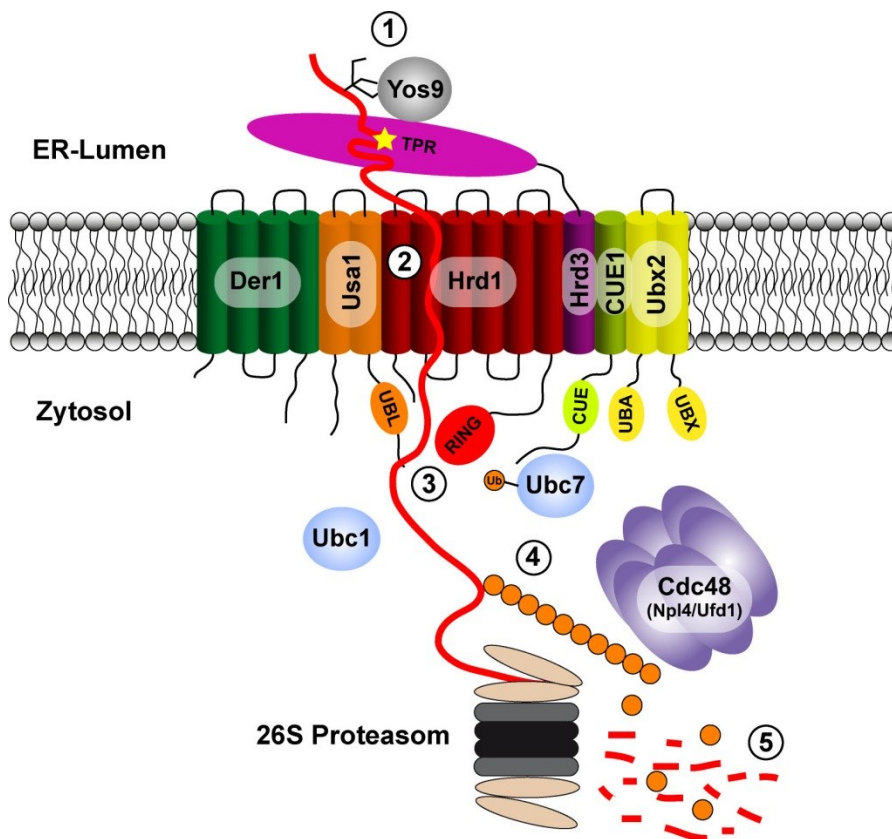


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Proteinabbaus über die HRD-Ubiquitinligase des ERAD-Systems. Terminal fehlgefaltete Proteine werden im ER-Lumen durch Substratrekrutierungsfaktoren (Yos9 und Hrd3) der HRD-Ubiquitinligase erkannt und gebunden (1). Nach einem Transport vom ER-Lumen in das Zytosol wird das Substrat durch die Ubiquitinligase Hrd1 polyubiquitiniert (3). Anschließend löst die AAA-ATPase Cdc48 das Substrat vom Ligase-Komplex ab (4) und überführt es zum 26S Proteasom, wo der proteolytische Abbau des Proteins erfolgt (5).

TPR = *Tetratricopeptide repeat*-Motiv, UBL = *Ubiquitin like*-Motiv, CUE = *Coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation*-Motiv, UBA = *Ubiquitin associated*-Motiv, UBX = *Ubiquitin regulatory X*-Motiv

1.3.2 Die Erkennung fehl- und ungefalteter Proteine im ER

Unmittelbar nach der Translokation über den Sec61-Komplex in das ER-Lumen wird ein Großteil der Proteine N-glykosyliert [25,26]. Anschließend entfernen die Glucosidasen I und II zwei Glukose-Einheiten der Glykanstruktur, was eine Bindung des Glykoproteins mit den Lektinen Calretikulin und Calnexin induziert. Die Chaperon-Aktivität beider Lektine unterstützt hierbei die Faltung des Glykoproteins. Das Abspalten einer weiteren Glukose-einheit verringert die Affinität des Glykoproteins zu den beiden Lektinen und ermöglicht den Weitertransport über den sekretorischen Weg. Ist die Faltung allerdings noch nicht abgeschlossen, wird das Protein in höheren Eukaryoten durch die UDP-Glukose-Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGT1) reglykosyliert und damit dem Calnexin/Calretikulin-Zyklus wieder zugefügt [27]. Da UGT1 in *S. cerevisiae* nicht vorhanden ist, kann der Calnexin/Calretikulin-Zyklus hier nur einmal durchlaufen werden. Falls weiterhin keine native Struktur ausgebildet werden kann, entfernen die Mannosidasen ER Mannosidase I (in *S. cerevisiae* Mns1) und EDEM-1,2,3 (in *S. cerevisiae* Htm1/Mnl1) zwei Mannose-Einheiten der Glykanstruktur, was zu einer Erkennung des Proteins durch die HRD-Ligase über die Lektine OS-9 und XTP3-B (in *S. cerevisiae* Yos9) führt [28-34]. Neben einer bestimmten Glykanstruktur ist auch die Exposition von hydrophoben Bereichen im Protein notwendig, um von der HRD-Ligase als Substrat erkannt zu werden. Die Erkennung und Bindung dieser Bereiche erfolgt in *S. cerevisiae* durch die luminale Domäne des Hrd1-assoziierten Faktors Hrd3, der somit als Substratrezeptor der HRD-Ligase wirkt [35,36]. Der Abbau von ausschließlich terminal fehl-/ungefalteten Proteinen beruht demzufolge auf der Erkennung eines bipartiten Signals, das aus einer bestimmten Glykanstruktur und der Exposition hydrophober Bereiche besteht.

1.4 Die *unfolded protein response* - ein adaptiver Mechanismus der Protein-Qualitätskontrolle am ER

Die Protein-Qualitätskontrolle am ER verhindert den Weitertransport und eine Anreicherung terminal fehl-/ungefalteter Proteine im ER-Lumen, indem es diese erkennt und über das UP-System abbaut. Bestimmte Umstände wie z.B. zellulärer Stress können die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung erhöhen und damit zu einer Überforderung des ERAD-Systems führen. Bei einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen kommt es zu der Aktivierung eines Signalweges (*unfolded protein response*, UPR), der vor allem die Expression von molekularen Chaperonen und Proteinen des proteolytischen Proteinabbaus stimuliert, um dadurch die Protein-Homöostase in der Zelle wiederherzustellen. Neben den Ubiquitinligasen des ERAD-Systems sind auch Komponenten der HRD-Ligase wie z.B. *HRD3* und *DER1* Zielgene der UPR [37]. Die UPR kann

über drei verschiedene Stresssensoren (ATF6, PERK, IRE1 α) initiiert werden [38]. In niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* ist dagegen nur der stark konservierte Signalweg des Stresssensors Ire1 vorhanden. Bei Ire1 handelt es sich um ein integrales ER-Membranprotein, das im Lumen eine Stresssensor-Domäne und auf der zytosolischen Seite eine Kinase- und Endoribonukleaseaktivität aufweist. Im inaktiven Zustand liegt Ire1 als Monomer vor, das auf der luminalen Seite mit Kar2 (BiP in Säugerzellen) assoziiert ist. Bei einer hohen Konzentration an fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen kommt es zu einer Dissoziation von Kar2. Gleichzeitig binden fehlgefaltete Proteine an die Stresssensor-Domäne von Ire1, was schließlich eine Oligomerisierung des Proteins bewirkt [39]. Es folgt eine Autophosphorylierung der zytosolischen Domäne und schließlich die Induktion der Endoribonukleaseaktivität von Ire1. Welche Bedeutung die Dissoziation von Kar2 bei der Aktivierung von Ire1 hat, ist bisher noch unklar [2]. Die Endoribonukleaseaktivität katalysiert die Entfernung eines speziellen Introns aus der mRNA des Transkriptionsfaktors Hac1 (XBP1 in Säugerzellen), so dass nun eine Translation dieses Proteins möglich ist. Als Transkriptionsfaktor bindet Hac1 an bestimmte Sequenzmotive in der DNA (*UPR-response elements*, UPRE) und reguliert dadurch die Expression der UPR-Zielgene. Gelingt es über diese Mechanismen nicht, die Protein-Homöostase im ER wiederherzustellen, kann durch eine langanhaltende UPR-Induktion auch die Apoptose der Zelle induziert werden [38].

1.5 Die Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER

1.5.1 Generelle Aspekte des Exportprozesses von ERAD-Substraten

Nach der Erkennung und Rekrutierung zur HRD-Ligase müssen die fehlgefalteten Proteine vom ER-Lumen in das Zytosol transportiert werden, da nur dort eine Ubiquitinierung durch die ERAD-Ubiquitinligasen erfolgen kann. Der Mechanismus und die Komponenten des Proteinexports sind bisher noch unbekannt und stellen daher eine zentrale Frage der Protein-Qualitätskontrolle am ER dar. Dennoch lassen sich anhand bereits charakterisierter zellulärer Transportsysteme Aussagen über die Beschaffenheit des ER-Exportkomplexes machen. Da es sich bei der Protein-Dislokation um einen gerichteten Transport in das Zytosol handelt, ist davon auszugehen, dass dieser Vorgang energieabhängig ist. Auch der Proteinimport in Mitochondrien ist sowohl von der Aktivität des Chaperons Hsc70 als auch von einem Protonengradienten zwischen Zytosol und Matrix abhängig. Hsc70 ist mit dem Importkomplex (TOM/TIM-Komplex) der Mitochondrien assoziiert und zieht unter ATP-Verbrauch das zu transportierende Protein in die mitochondriale Matrix [40]. Eine ähnliche Funktion wurde auch für das Chaperon BiP beim

posttranslationalen Import von Proteinen in das ER-Lumen durch den Sec61-Komplex festgestellt [41]. Während über die Importsysteme der Mitochondrien und des ER ausschließlich entfaltete Proteine transportiert werden können, sind die Substrate des ERAD-Systems strukturell sehr unterschiedlich. Zum einen sind die Substrate in der Regel zumindest partiell gefaltet und möglicherweise mit weiteren Untereinheiten assoziiert. Zum anderen weisen Glykoproteine eine sehr komplexe Glykanstruktur auf, die aufgrund der hohen Hydrophilie und des sperrigen Aufbaus spezielle Anforderungen an das Transportsystem stellt. Falls es sich bei dem ER-Exportkomplex ähnlich wie in anderen Organellen um einen Kanal oder eine Pore handelt, hat dies zur Konsequenz, dass der Kanaldurchmesser wesentlich größer sein muss als im Fall des Importsystems des ER und der Mitochondrien. Eine große Kanalöffnung bedingt wiederum eine strikte Regulierung des Proteinexports, um das oxidierende Milieu und den Ionenhaushalt des ER aufrechtzuerhalten. Ebenso sollte das ER-Dislokton mit Substratrezeptoren assoziiert sein, um nach der Substraterkennung und -rekrutierung einen effizienten Transport fehlgefalteter Proteine aus dem ER zu ermöglichen. Da die Polyubiquitinierung von Substraten nicht nur für den proteasomalen Abbau sondern auch für die Dislokation aus dem ER-Lumen essentiell ist, sollte sich der Transportkomplex auch in der Nähe der ERAD-Ubiquitinligasen befinden [42,43]. Die besondere Schwierigkeit bei der Identifizierung des ER-Exportkanals im Vergleich zu anderen zellulären Transportsystemen liegt vor allem darin, dass der Exportprozess zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht gestoppt werden kann und damit die Isolierung eines Transportkomplexes, in dem das Substrat im Kanal arretiert ist, nicht möglich ist. Bei der Charakterisierung des Sec61-Komplexes als ER-Translokton wurde eine modifizierte mRNA verwendet, die zum einen kein Stop-Codon enthielt. Dadurch wurde die Ablösung der Polypeptidkette vom Ribosom verhindert und das Transportintermediat im Kanal arretiert. Zum anderen codierte die mRNA an einer bestimmten Position des Proteins die Inkorporation einer photoreaktiven Aminosäure, die nach UV-Bestrahlung Quervernetzungen zu Komponenten des Translokons ausbildete [44]. Der Importkomplex in Mitochondrien wurde mithilfe von Proteinchimären untersucht, die sich aus der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und der Matrix-Transportsequenz zusammensetzten. Die Bindung von Methotrexat stabilisierte die globuläre Struktur von DHFR und verhinderte dadurch den vollständigen Import des Fusionsproteins in die mitochondriale Matrix [45]. Auf diese Weise war eine ausführliche Charakterisierung des Importprozesses und der daran beteiligten Komponenten möglich.

1.5.2 Die Rolle des Sec61-Translokons beim Substratexport

Proteine des sekretorischen Weges werden über das Sec61-Translokon in das ER-Lumen transportiert. Die zentrale Komponente dieses Transportsystems ist Sec61 (in Säugerzellen Sec61 α), welches als integrales Membranprotein einen Kanal in der ER-Membran ausbildet [25,46]. Da Sec61 das einzige Protein im ER darstellt, für das eine Kanal-funktion bekannt ist, wird seit längerer Zeit auch über eine Beteiligung des Proteins bei der Dislokation von ERAD-Substraten spekuliert (Abb. 1.3). Eine wichtige Voraussetzung für eine Funktion als Exportkanal des ERAD-Systems ist die Wechselwirkung bzw. die räumliche Nähe zu fehlgefalteten Proteinen. Tatsächlich wechselwirkt Sec61 mit vollständig glykosylierten und damit bereits importierten ERAD-Substraten [47,48]. Ebenso konnte eine Assoziation von Sec61 mit Hrd3, einer Komponente der HRD-Ligase, festgestellt werden [48]. Die temperatursensitive Mutante Sec61-2 verhindert den Abbau von ERAD-Substraten, was zu einer Anreicherung des Substrats im ER-Lumen führt [49]. Der Import des Substrats in das ER scheint durch diese Mutante daher nicht gestört zu sein. Allerdings ist aufgrund der Funktion von Sec61 bei der Protein-Translokation in das ER der Einfluss der Sec61-Mutante auf den Abbau und den Export von ERAD-Substraten schwer zu beurteilen. So ist es möglich, dass der Abbaufekt der Mutante auf einen verzögerten Import zurückzuführen ist, der einen Transport in das ER-Lumen noch ermöglicht, aber eine Prozessierung über das ERAD-System erschwert. Auch die Fehlfaltung eines Proteins könnte den Importvorgang leicht verzögern, was eine verstärkte Wechselwirkung des Substrats mit dem Translokon zur Folge hätte. Außerdem könnten fehlgefaltete Proteine schon während oder unmittelbar nach dem Import die ERAD-Maschinerie rekrutieren und somit eine vollständige Dissoziation des Substrats vom Translokon verhindern [50]. Dies wäre eine Erklärung für die Interaktion von Sec61 mit ERAD-Substraten und Komponenten der HRD-Ligase. Ein weiteres Argument gegen eine Beteiligung beim Substratexport besteht in der Größe des Sec61-Kanals. Kristallstrukturuntersuchungen des bakteriellen SecYEG-Kanals, der homolog zum Sec61-Komplex ist, zeigen, dass die Kanalöffnung einen Durchmesser von maximal 2 nm aufweist und damit für die Dislokation von partiell gefalteten und posttranslational modifizierten Proteinen wahrscheinlich zu klein ist [25,51]. Weiterhin ist in der Kristallstruktur von SecYEG eine kurze Helix (*plug*) auf der luminalen Seite des Kanals zu erkennen, die im inaktiven Zustand des Translokons die Kanalöffnung verschließt [52]. Erst durch das Einführen eines Proteins auf der zytosolischen Seite des Kanals kann die Helix aus der Öffnung verdrängt und der Import ermöglicht werden. Somit scheint der Kanal nur von der zytosolischen Seite passierbar zu sein. Die Erkenntnisse der Kristallstrukturanalyse konnten mithilfe von biochemischen Experimenten bestätigt werden. Ein Fusionsprotein bestehend aus der schweren Kette des membranständigen Proteins MHC I (*Major*

Histocompatibility Complex I) und DHFR als luminale Domäne konnte auch nach einer Arretierung der globulären Struktur von DHFR durch Trimetrexat über das ERAD-System abgebaut werden, während ein Import dieses Fusionsproteins nur im entfalteten Zustand möglich war [53]. Dies deutet auf eine Beteiligung von zwei unterschiedlichen Transportmechanismen oder -komplexen für den Im- bzw. Export von Proteinen am ER hin.

1.5.3 Der1/Derlins als Komponenten des Exportkanals

Aufgrund ihrer zum Teil zahlreichen TM-Domänen werden neben dem Sec61-Translokon auch einige Faktoren der HRD-Ligase als mögliche Komponenten des Exportkomplexes angesehen. Einer dieser Faktoren ist das integrale Membranprotein Der1 in *S. cerevisiae* (Abb. 1.3). Der1 weist vier TM-Domänen und einen zytosolischen C- und N-Terminus auf [54]. Damit besteht bei einem Molekulargewicht von nur 24 kDa der weitaus größte Teil des Proteins aus TM-Domänen. Der1 wird über den C-Terminus des integralen Membranproteins Usa1 zur Ubiquitinligase Hrd1 rekrutiert und ist auf diese Weise mit der HRD-Ligase assoziiert [55]. Bereits in den ersten Untersuchungen zum ERAD-System konnte Der1 als ein essentieller Faktor für den Abbau von fehlgefalteten ER-luminalen Proteinen identifiziert werden. Die Proteolyse membranständiger Proteine wurde hingegen nicht durch eine Deletion von *DER1* beeinflusst [56-58]. Diese Erkenntnis sowie die Fähigkeit von Der1, Oligomere auszubilden, führten schließlich zu der Annahme, dass Der1 als eine Komponente des ER-Dislokons beim Export luminaler ERAD-Substrate beteiligt sein könnte [59]. Weitere Studien zeigten, dass Der1 unabhängig vom Substratrezeptor der HRD-Ligase, Hrd3, mit dem luminalen ERAD-Substrat CPY* wechselwirkt [35]. CPY* ist eine Mutante der vakuolären Carboxypeptidase Y, die aufgrund einer Fehlfaltung über das ERAD-System abgebaut wird. Daher wird neben einer Beteiligung bei der Protein-Dislokation auch eine Funktion von Der1 bei der Substratbindung an die HRD-Ligase postuliert. Das Der1-Homolog in *S. cerevisiae*, Dfm1 (*Der1-like Family Member*), besteht ebenfalls aus vier TM-Domänen und weist eine Sequenzähnlichkeit zu Der1 von 14 % auf [60]. Im Gegensatz zu Der1 enthält der C-Terminus von Dfm1 zwei konservierte SHP-Boxen, die eine Interaktion zu der AAA-ATPase Cdc48 vermitteln. Auch Dfm1 wechselwirkt mit Komponenten des ERAD-Systems und bildet wie Der1 Oligomere aus [59]. Allerdings konnte bisher ein Einfluss von Dfm1 nur auf den Abbau des integralen Membranproteins und Doa10-Substrats Ste6* festgestellt werden [61]. Die Proteolyse aller bisher bekannten löslichen ERAD-Substrate ist dagegen von Dfm1 unabhängig. Daher scheint trotz der Topologieähnlichkeit ein wesentlicher funktioneller Unterschied zwischen Der1 und Dfm1 zu bestehen. In Säugerzellen werden drei Homologe von Der1 exprimiert, die als Derlin-1, -2, und -3 (*Der1-like protein*) bezeichnet werden. Die

Sequenzähnlichkeit von Der1 zu Derlin-2 und -3 beträgt ~20 % und ist damit etwas höher als zu Derlin-1 (15 %). Die Derlins sind wie Der1 mit der HRD-Ligase assoziiert. So bindet Derlin-1 an die Ubiquitinligasen Hrd1 und gp78 sowie über eine C-terminale SHP-Box an das Cdc48-Homolog p97/VCP [62-64]. Für Derlin-2 und -3 wurde zudem eine Wechselwirkung zu den EDEMs nachgewiesen [65]. Im Gegensatz zu Der1 sind die Derlins nicht nur am Abbau löslicher sondern auch membranständiger ERAD-Substrate beteiligt [66,67]. Indizien für eine Funktion der Derlins bei der Dislokation von ERAD-Substraten basieren zum einen auf der Beobachtung, dass Derlin-1 mit luminalen sowie bereits exportierten Substraten interagiert und daher möglicherweise auch während des Exportprozesses mit Substraten assoziiert ist [66]. Zum anderen konnte durch eine *in vitro*-Studie mit isolierten ER-Mikrosomen gezeigt werden, dass die Inhibierung der Derlin-1-Funktion durch α -Derlin-1-Antikörper die Dislokation eines luminalen ERAD-Substrats verhindert, während eine Behandlung mit α -Sec61-Antikörpern keinen Einfluss auf den Transportprozess hatte [68]. Auch der Export von viralen Toxinen, die das ERAD-System für die Freisetzung in das Zytosol ausnutzen, ist von Derlin-1 abhängig [69]. Die Fähigkeit Oligomere auszubilden, unterstreicht schließlich die Vermutung, dass Derlin-1 als eine Komponente des Dislokons dienen könnte [62]. Nach einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigt Derlin-1 eine Sequenzähnlichkeit zu den Rhomboid-Proteasen auf, wobei allerdings die katalytisch aktiven Aminosäurereste fehlen. Dennoch verzögern Punktmutationen in den Rhomboid-ähnlichen Bereichen den Abbau des luminalen ERAD-Substrats NHK (*Null Hong Kong mutant of α 1-antitrypsin*) ohne die Interaktion zu p97/VCP zu beeinflussen [64]. Da Rhomboid-Proteasen durch eine Deformierung der Membranstruktur die Proteolyse von Membranproteinen erleichtern, wird eine ähnliche Funktion auch für inaktive Rhomboid-Proteasen wie Derlin-1 bei der Dislokation von ERAD-Substraten angenommen. Die Beeinflussung der Membranstruktur könnte demnach den Transport durch die Membran oder auch die Ablösung exportierter Substrate vom Transportkomplex ermöglichen.

1.5.4 ERAD-Ubiquitinligasen als Komponenten des Exportkanals

Beide Ubiquitinligasen des ERAD-Systems in *S. cerevisiae* weisen eine recht hohe Anzahl an TM-Domänen auf. Hrd1 ist mit 6 und Doa10 mit 14 TM-Domänen in der ER-Membran verankert [70,71]. Außerdem bestehen die TM-Segmente von Hrd1 aus einem außergewöhnlich hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren. Die Mutation einiger dieser hydrophilen Aminosäuren beeinträchtigte den Abbau verschiedener membranständiger ERAD-Substrate ohne die Assemblierung der HRD-Ligase zu stören. Dagegen war die Proteolyse fehlgefalteter luminaler Proteine durch die Mutationen nicht betroffen [72].

Somit scheinen die TM-Domänen von Hrd1 bei der Erkennung und dem Abbau fehlgefalteter integraler Membranproteine beteiligt zu sein. In einer weiteren Studie konnten mittels *in vivo photocrosslinking* Quervernetzungen eines luminalen ERAD-Substrats zu den TM-Segmenten von Hrd1 beobachtet werden, was auf eine direkte Funktion zumindest einiger TM-Domänen beim Exportprozess bzw. bei der Ausbildung eines Exportkanals hindeutet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine starke Überexpression von Hrd1 die Deletion aller weiteren HRD-Ligase-Komponenten kompensiert und Hrd1 damit den Abbauprozess unter bestimmten Voraussetzungen selbständig durchführen kann [73]. Ebenso ist Hrd1 in der Lage, in Abhängigkeit von Usa1 Oligomere auszubilden. Gelfiltrationsanalysen zufolge beträgt die Größe der gesamten HRD-Ligase 600-800 kDa, was einer Dimerisierung des Komplexes entsprechen würde [22,55]. Auch für einige Ubiquitinligasen des ERAD-Systems in Säugerzellen gibt es Hinweise auf eine Dimerisierung [74,75]. Auf diese Weise könnte eine recht große Kanalöffnung ausgebildet werden, die auch den Transport teilweise gefalteter und modifizierter Proteine ermöglicht. Des Weiteren scheint die Oligomerisierung der HRD-Ligase für den Abbau zumindest einiger Substrate notwendig zu sein, was die funktionelle Bedeutung des Hrd1-Oligomers belegt [55,73]. Die HRD-Ligase als Multienzymkomplex, der alle Abbauschritte des ERAD-Systems miteinander verbindet, würde letztendlich ein sehr effizientes und kompaktes Modell der Protein-Qualitätskontrolle am ER darstellen (Abb. 1.3).

1.5.5 Lipid Droplets als Alternative zu einem Kanal-basierten Transportsystem

Trotz der Fähigkeit der HRD-Ligase zur Oligomerisierung ist es weiterhin unklar, ob der Export von partiell gefalteten ERAD-Substraten durch einen Kanal oder eine Pore möglich ist. Eine Alternative für einen Kanal-basierten Transportmechanismus ist die Ausbildung von vesikulären Strukturen an der ER-Membran wie z.B. *Lipid Droplets* [76] (Abb. 1.3). Diese bestehen aus einem Kern an Triglyzeriden und Cholesterolestern, der von einer einfachen Phospholipidschicht umgeben ist [77]. Neben neutralen Lipiden können *Lipid Droplets* auch zahlreiche Enzyme des Lipidstoffwechsels sowie GTPasen (Rab-Proteine) und Chaperone enthalten [78]. Daher scheinen diese vesikulären Strukturen nicht nur als Lipidspeicher zu dienen sondern auch in diversen zellulären Prozessen involviert zu sein. *Lipid Droplets* entstehen durch eine Akkumulation von Lipiden in der Lipiddoppelschicht der ER-Membran, was letztendlich zu der Abschnürung eines Vesikels führen kann. Untersuchungen zeigen, dass *Lipid Droplets* beim Abbau des Lipoproteins ApoB am ER beteiligt sind [78,79]. ApoB wird hierbei in den *Lipid Droplets* angereichert, die dann als

Plattform für die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau des Proteins dienen. Auch ERAD-Faktoren wie Derlin-1 und das p97/VCP-bindende Protein UBX8D sind für den *Lipid-Droplet* vermittelten Abbau von ApoB erforderlich, was auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Protein-Qualitätskontrolle am ER und der Ausbildung dieser vesikulären Strukturen hindeutet [80]. Allerdings konnte in *S. cerevisiae* kein Einfluss von *Lipid Droplets* auf den Abbau verschiedener ERAD-Substrate festgestellt werden [81]. Zum einen ist es möglich, dass sich in Säugerzellen aufgrund der Vielzahl an Substraten mehrere Abbau- und Exportmechanismen entwickelt haben. Zum anderen könnten *Lipid Droplets* nur für den Abbau bestimmter Membranproteine oder großer Proteinaggregate benötigt werden. Dies korreliert mit Ergebnissen einer Studie, die eine Stimulierung der *Lipid-Droplet*-Bildung durch ER-Stress zeigt [82].

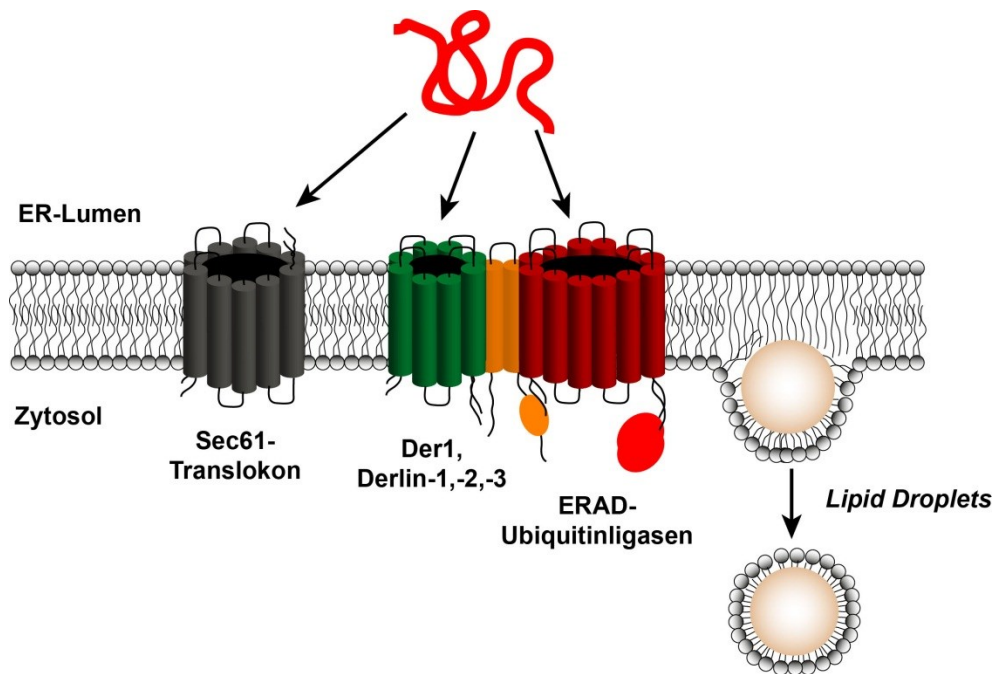


Abb. 1.3: Möglichkeiten der Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER-Lumen. Aufgrund der umfassend dokumentierten Kanaleigenschaften des Sec61-Translokons wird eine Funktion dieses Komplexes auch beim Exportprozess vermutet. Kristallstrukturanalysen zufolge scheint der ausgebildete Kanal allerdings für den Export partiell gefalteter ERAD-Substrate nicht passierbar zu sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Dislokation von Substraten über die HRD-Ligase. Insbesondere Untersuchungen zu Der1 (in Säugerzellen Derlin-1,-2,-3) und den ERAD-Ubiquitinligasen zeigen Indizien für eine Beteiligung dieser integralen Membranproteine beim Exportprozess. Die Größe und Sperrigkeit der ERAD-Substrate erfordert wahrscheinlich die Ausbildung eines recht großen Kanals, der sich aus mehreren Komponenten der HRD-Ligase zusammensetzt. Eine Alternative zum Kanal-basierten Exportsystem ist die Abschnürung vesikulärer Strukturen von der ER-Membran, sogenannte *Lipid Droplets*. Dieser Mechanismus scheint jedoch nur für den Export und Abbau bestimmter Membranproteine von Bedeutung zu sein. Modifiziert nach [50].

1.5.6 Die Rolle der AAA-ATPase Cdc48 bei der Protein-Dislokation

Gerichtete Transportprozesse in Zellen sind in der Regel energieabhängig und daher auf die Funktion von ATPasen angewiesen. In der Tat sind die Ubiquitinligasen des ERAD-Systems auf der zytosolischen Seite der ER-Membran mit der AAA-ATPase Cdc48 assoziiert. In *S. cerevisiae* wird Cdc48 über die UBX-Domäne des integralen Membranproteins Ubx2 zu den beiden Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 rekrutiert [83,84]. Die Ubiquitinligase gp78 in Säugerzellen ist hingegen in der Lage, das Cdc48-Homolog p97/VCP direkt zu binden [85]. Für eine Funktion beim Abbau von ERAD-Substraten ist der Cdc48-Komplex mit den Ubiquitin-bindenden Proteinen Ufd1 und Npl4 sowie mit dem Ubiquitin-Elongationsenzym (E4) Ufd2 und verschiedenen deubiquitinierenden Enzymen assoziiert [14,86-88]. Mutationen, die die Funktionalität des Cdc48-Komplexes beeinträchtigen, haben eine Anreicherung von polyubiquitinierten Substraten auf der zytosolischen Seite der ER-Membran zur Folge und inhibieren schließlich den proteasomalen Abbau von ERAD-Substraten [43,89]. Cdc48 scheint demnach über die Ko-Faktoren Npl4 und Ufd1 an polyubiquitinierte Substrate zu binden, um dann den finalen Schritt des Exportprozesses, nämlich die Extraktion der Substrate von der HRD-Ligase und der ER-Membran, durchzuführen. Auf diese Weise stellt die ATPase-Aktivität des Cdc48-Komplexes die treibende Kraft („*driving force*“) des Transportprozesses dar. Des Weiteren wird anhand dieses Modells deutlich, dass die Ubiquitinierung von ERAD-Substraten nicht nur für den proteasomalen Abbau sondern auch für die Cdc48-vermittelte Protein-Dislokation aus dem ER notwendig ist.

1.5.7 Das Importsystem der Peroxisomen als Modell für den Exportprozess am ER

Der Import von Proteinen in Peroxisomen stellt ähnliche Anforderungen an das Transportsystem wie der Export von ERAD-Substraten aus dem ER. So können über das Importsystem der Peroxisomen (Importomer) vollständig gefaltete und sogar oligomerisierte Proteinkomplexe transportiert werden. *In vitro-Studien* zufolge könnte dies durch die Ausbildung einer dynamisch organisierten Pore ermöglicht werden, die sich an die Größe des zu importierenden Proteins anpasst [90]. Interessanterweise zeigt das Importsystem der Peroxisomen sowohl in der Zusammensetzung als auch auf mechanistischer Ebene deutliche Ähnlichkeiten zum ERAD-System auf. Beide Systeme bestehen aus einem Multienzymkomplex, der Substratrezeptoren, Ubiquitinligasen und AAA-ATPasen enthält [91]. Zentraler Bestandteil des Importomers ist der Substratrezeptor Pex5, der zunächst als lösliche Komponente peroxisomale Matrixproteine im Zytosol bindet und dann an die Peroxisomenmembran rekrutiert. Dies erfolgt durch die Integration

von Pex5 in die Peroxisomenmembran über den Membranrezeptor Pex14 [92]. Die beiden Peroxine Pex5 und Pex14 bilden nun zusammen eine Pore aus, deren Durchmesser maximal 9 nm beträgt und damit auch für gefaltete Proteine passierbar ist [90]. Die erst durch das Matrixprotein induzierte Porenbildung stellt einen effizienten Regulierungsmechanismus dar, der ein unkontrolliertes Austreten von löslichen Stoffen aus dem Peroxisom verhindert. Nach dem Import des Matrixproteins in das Peroxisom wird der Substratrezeptor Pex5 wieder in das Zytosol transportiert. Dieser Vorgang zeigt weitere mechanistische Ähnlichkeiten zum ERAD-System auf. Für die Extraktion aus der Peroxisomenmembran muss Pex5 durch die Ubiquitinligasen Pex2 und Pex12 des Importomers ubiquitiniert werden [93]. Anschließend wird das ubiquitinierte Pex5 mithilfe der AAA-ATPasen Pex1 und Pex6 aus der Peroxisomenmembran herausgelöst und in das Zytosol freigesetzt [94]. Die Polyubiquitinierung von Pex5 induziert den proteasomalen Abbau des Proteins, während eine Monoubiquitinierung einen weiteren Importzyklus ermöglicht. Aufgrund der mechanistischen Ähnlichkeit und der Fähigkeit, auch große Proteinkomplexe zu transportieren, stellt das Importomer der Peroxisomen eine Parallele für die Dislokation von ERAD-Substraten aus dem ER dar.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Dislokation aus dem ER-Lumen in das Zytosol ist die Voraussetzung für die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau fehlgefalteter Proteine des sekretorischen Weges. Somit stellt der Exportprozess durch die ER-Membran einen zentralen Bestandteil der Protein-Qualitätskontrolle am ER dar. Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der HRD-Ubiquitinligase-Untereinheit Der1 beim Export und Abbau von ERAD-Substraten in der Hefe *S. cerevisiae*. Hierzu sollte mithilfe biochemischer und zellbiologischer Versuchsansätze zunächst die Integration von Der1 in die HRD-Ligase und die Bedeutung der zum Teil konservierten TM-Domänen für die Dislokation luminaler ERAD-Substrate analysiert werden. Mittels zielgerichtetem *in vivo photocrosslinking* sollten schließlich Erkenntnisse über die Topologie der HRD-Ligase und die räumliche Nähe der Der1 TM-Domänen zum Substrat gewonnen werden, um weitere Anhaltspunkte für eine Funktion dieser Bereiche beim Transportprozess und bei der Ausbildung eines putativen Exportkanals in der ER-Membran zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Standard-Chemikalien wie z.B. NaCl, MgCl₂ und Ethanol wurden von Roth oder Sigma bezogen.

Acrylamid (40 % (w/v))	Serva
Adeninsulfat	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Bacto™ Pepton	BD Biosciences
Bacto™ Trypton	BD Biosciences
Bacto™ <i>Yeast Extract</i>	BD Biosciences
p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBpa)	Bachem
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Roche
Brij 58	BioChemica
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie	Serva
Cycloheximid	Fluka
L-Cystein	Sigma
Desoxyribonukleinsäuretriphosphate (dNTPs)	Roche
Digitonin	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma
5-Fluoruracil-4-carbonsäure (5-FOA)	Fermentas
G418	PAA
Glasperlen Ø 0,4-0,6 mm	BioSpec
Glycerin	Sigma
Harnstoff	Roth
HEPES	Sigma
Heringssperma-DNA	Sigma
L-Histidin	Sigma
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth
Kanamycin	Roth
L-Leucin	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magermilchpulver	Roth
L-Methionin	Sigma
N,N'-Methylenbisacrylamid (2 % (w/v))	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nonidet® P40 <i>Substitute</i> (NP40)	Roche
Oligonukleotide	BioTez
PEG 3350	Sigma

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (49,5:49,5:1)	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Protein A-Sepharose™ 4FastFlow	GE Healthcare
RedSafe	IntRON
S ³⁵ Protein Labeling-Mix	Amersham Bioscience
N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
Tween 20	Sigma
Uracil	Fluka
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	BD biosciences

2.1.2 Enzyme

N-Glykosidase F	Roche
<i>Pfu Ultra™ HF</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Roth
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
Zymolyase	MB Biomedicals

2.1.3 Größenstandards

<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i>	New England Biolabs
<i>Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas
λ -DNA (<i>HindIII</i>)	Serva
1 kb DNA Ladder	Invitrogen

2.1.4 Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme

<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche Applied Science
<i>pGEM®-T Easy Vector System</i>	Promega
<i>QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies
<i>Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus</i>	PerkinElmer
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega

2.1.5 Geräte und sonstige Materialien

Äkta FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
BioMax MR Film	Kodak
Brutschrank B500	Memmert
<i>Centrifuge 5424R</i>	Eppendorf
<i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf
Durchlichtmikroskop Standard 25	Zeiss
<i>Electrophoresis Mighty Small II</i>	Hoefer

<i>Gel dryer</i> Model 583	BioRad
<i>Gene Pulser</i>	BioRad
IKA Vibrax VXR basic	IKA
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick Scientific
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma Laboratory Centrifuges
Magnetrührer IKamag RCT	IKA
<i>Mighty Small Transfer Tank TE22</i>	Hoefer
Mikromanipulator	Singer Instruments
<i>Mini Horizontal Agarose Electrophoresis Unit HE33</i>	Hoefer
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
PCR-Maschine Primus 25	peQLab
pH-Meter	Schott
Phosphorimager Typhoon FLA9500	GE Healthcare
<i>Power Pac 300</i>	BioRad
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Roth
Spectrophotometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Bioscience
Superdex 200-FPLC-Säule	GE Healthcare
<i>Thermomixer Compact</i>	Eppendorf
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman Coulter
UV-Lampe (B-100AP)	UVP
UV-Transilluminator Gel-Doc	peQLab
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Fisons DC1 W13	HAAKE
<i>Whatman Blotting-Papier</i>	Roth
Fuji X-Ray Film Processor RGII	Fuji
Zellkulturmaterial	Greiner Bio One

2.1.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 blue	Agilent Technologies
-------------------------	----------------------

2.1.7 Hefestämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten und in der Tab. 2.1 aufgelisteten Hefestämme sind Derivate des Hefestamms YW01. Die Darstellung des Genotyps ist daher auf die Gene beschränkt, die im Vergleich zum YW01-Stamm verändert wurden. Nicht bestimmt = n.b.

Tab. 2.1: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
YW01	<i>trp1-1 (am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3, -112, MATα</i>	Biederer et al., 1997 [95]
YTX140	<i>prc1-1, MATα</i>	Biederer et al., 1997 [95]
YJU32	<i>Δder1::HIS3, prc1-1, MATα</i>	J. Urban, 2004
YJU37	<i>Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	J. Urban, 2004
YJU39	<i>ubc7 C89S, prc1-1, MATα</i>	J. Urban, 2004

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
YBM70	<i>Δhrd3::LEU2, prc1-1, MATα</i>	B. Meußer, 2004
YSH029	<i>Δusa1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	S. Horn, 2006
YTX372	<i>der1-13xMyc:KanMX6, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2004
YSH061	<i>der1-13xMyc:TRP1, Δusa1::KanMX6, prc1-1, MATα</i>	S. Horn, 2007
YTX378	<i>der1-13xMyc:KanMX6, Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2005
YTX539	<i>der1-13xMyc:KanMX6, Δubx2::TRP1, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2005
YTX481	<i>der1-13xMyc:KanMX6, Δhrd3::LEU2, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2005
YTX623	<i>der1 (Δ190-211)-13xMyc:KanMX6, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2006
YTX624	<i>der1 (Δ167-211)-13xMyc:KanMX6, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2006
YTX645	<i>Δusa1::TRP1, Δhrd1::LEU2, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YMM010	<i>Δhrd1::LEU2, Δdoa10::HIS3, Δusa1::KanMX6, prc1-1, MAT n.b.</i>	diese Arbeit
YMM183	<i>6xHA-der1:LEU2, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YMM184	<i>6xHA-der1:KanMX6, Δubc7::LEU2, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YMM185	<i>9xMyc-der1:LEU2, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YMM186	<i>9xMyc-der1:KanMX6, Δubc7::LEU2, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YRG092	<i>der1-6xHA:TRP1, prc1-1, MATα</i>	R. Gauss, 2004
YMM060	<i>usa1-3xmyc:KanMX6, Δder1::HIS3, Δubc7::LEU2, prc1-1, MAT n.b.</i>	diese Arbeit
YTX632	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, Δder1::HIS3, Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YJU38	<i>Δder1::HIS3, Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	J. Urban, 2004
YTX741	<i>6xMyc-hmg2:URA3, Δubc7::LEU2, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2008
YMM172	<i>6xMyc-hmg2:URA3, der1-13xMyc:KanMX6, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YTX649	<i>Δusa1::TRP1, Δder1::HIS3, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YTX625	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YTX635	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, Δder1::HIS3, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YTX629	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YSH031	<i>usa1-6xHA:TRP1, prc1-1, MATα</i>	S. Horn, 2006
YTX640	<i>usa1 (Δ259-312)-6xHA, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YMM160	<i>usa1 (Δ319-418)-6xHA, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YMM161	<i>usa1 (Δ372-418)-6xHA, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit
YTX639	<i>usa1 (Δ1-535)-6xHA, prc1-1, MATα</i>	E. Jarosch, 2007
YMM002	<i>usa1 (Δ259-312)-6xHA, der1-13xMyc:TRP1, prc1-1, MATα</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
YMM170	<i>usa1</i> (Δ 319-418)-6xHA, <i>der1</i> -13xMyc:TRP1, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM171	<i>usa1</i> (Δ 372-418)-6xHA, <i>der1</i> -13xMyc:TRP1, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM007	<i>usa1</i> (Δ 1-535)-6xHA, <i>der1</i> -13xMyc:TRP1, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM011	<i>der1</i> -13xmyc:TRP1, Δ <i>usa1</i> ::KanMX6, Δ <i>hrd1</i> ::LEU2, Δ <i>doa10</i> ::HIS3, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM046	<i>der1</i> -13xmyc:TRP1, Δ <i>hrd1</i> ::LEU2, Δ <i>doa10</i> ::HIS3, Δ <i>ire1</i> ::LEU2, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM047	<i>der1</i> -13xmyc:TRP1, Δ <i>hrd1</i> ::LEU2, Δ <i>usa1</i> ::KanMX6, Δ <i>doa10</i> ::HIS3, Δ <i>ire1</i> ::LEU2, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM051	<i>der1</i> (Δ 190-211)-13xMyc:KanMX6, Δ <i>hrd1</i> ::TRP1, Δ <i>doa10</i> ::HIS3, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM056	<i>der1</i> (Δ 167-211)-13xMyc:KanMX6, Δ <i>hrd1</i> ::TRP1, Δ <i>doa10</i> ::HIS3, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM001	Δ <i>hrd1</i> ::LEU2, Δ <i>usa1</i> ::KanMX6, <i>der1</i> -13xMyc:TRP2, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YTX297	<i>hrd1</i> -3xHA:HIS3, <i>prc1</i> -1, MATa	E. Jarosch, 2004
YSH084	<i>hrd1</i> -3xHA:KanMX6, Δ <i>usa1</i> ::TRP2, <i>prc1</i> -1, MATa	S. Horn, 2009
YMM135	Δ <i>hrd1</i> ::LEU2, Δ <i>usa1</i> ::KanMX6, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM187	Δ <i>der1</i> ::HIS3, Δ <i>hrd3</i> ::LEU2, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YTX380	<i>hrd1</i> -3xHA:KanMX6, <i>ubc7</i> C89S, <i>prc1</i> -1, MATa	E. Jarosch, 2004
YMM200	<i>hrd1</i> -3xHA:HIS3, <i>ubc7</i> C89S, Δ <i>der1</i> ::TRP1, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM201	<i>hrd1</i> -3xHA:HIS3, <i>ubc7</i> C89S, Δ <i>hrd3</i> ::LEU2, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM202	<i>hrd1</i> -3xHA:HIS3, <i>ubc7</i> C89S, Δ <i>der1</i> ::TRP1, Δ <i>hrd3</i> ::LEU2, <i>prc1</i> -1, MAT n.b.	diese Arbeit
YMM156	<i>der1</i> N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM111	<i>der1</i> R17L N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM112	<i>der1</i> R17L C23L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM140	6xMyc-hmg2:URA3, <i>der1</i> N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM141	6xMyc-hmg2:URA3, <i>der1</i> R17L C23L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM142	6xMyc-hmg2:URA3, <i>der1</i> R17L N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YTX836	Δ <i>pep4</i> ::URA3, <i>prc1</i> -1, MATa	E. Jarosch, 2008
YMM143	Δ <i>pep4</i> ::URA3, <i>der1</i> N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM144	Δ <i>pep4</i> ::URA3, <i>der1</i> R17L C23L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit
YMM145	Δ <i>pep4</i> ::URA3, <i>der1</i> R17L N73L, <i>prc1</i> -1, MATa	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
YTX837	<i>Δpep4::URA3, Δder1::HIS3, prc1-1, MATa</i>	E. Jarosch, 2008
YTX740	<i>6xMyc-hmg2:URA3, Δhrd1::TRP1, prc1-1, MATa</i>	E. Jarosch, 2008
YMM118	<i>der1 R17L C23L-13xMyc:HIS3, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM119	<i>der1 R17L N73L-13xMyc:HIS3, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM203	<i>der1 N73L-13xMyc:TRP1, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM132	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, der1 N73L, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM133	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, der1 R17L C23L, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM134	<i>usa1-3xMyc:KanMX6, der1 R17L N73L, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit
YTX817	<i>prc1-1-13xMyc:TRP1, MATa</i>	E. Jarosch, 2008
YTX865	<i>prc1-1-13xMyc:TRP1, rpt4R, MATa</i>	E. Jarosch, 2010
YTX822	<i>prc1-1-13xMyc:TRP1, Δder1::HIS3, MATa</i>	E. Jarosch, 2008
YMM138	<i>prc1-1-13xMyc:TRP1, der1 R17L C23L, MATa</i>	diese Arbeit
YMM139	<i>prc1-1-13xMyc:TRP1, der1 R17L N73L, MATa</i>	diese Arbeit
YMM158	<i>ubc7 C89S, Δder1::HIS3, prc1-1-3xHA:KanMX6, MATa</i>	diese Arbeit
YMM191	<i>Δder1::HIS3, ubc7 C89S, Δusa1::TRP1, prc1-1, MAT n.b.</i>	diese Arbeit
YRG184	<i>Δder1::HIS3, hrd3 (Δ769-833):KanMX6, prc1-1, MATa</i>	R. Gauss, 2005
YMM190	<i>ubc7 C89S, Δder1::HIS3, Δhrd3::TRP1, prc1-1-3xHA:KanMX6, MATa</i>	diese Arbeit
YMM199	<i>Δder1::HIS3, ubc7 C89S, prc1-1-3xHA:KanMX6, Δusa1::TRP1, MATa</i>	diese Arbeit
YMM179	<i>der1-13xMyc:TRP1, Δusa1::HIS3, MAT n.b.</i>	diese Arbeit
YMM157	<i>ubc7 C89S, Δder1::HIS3, prc1-1, MATa</i>	diese Arbeit

2.1.8 Plasmide

Für die Generierung von pBpa-markierten Der1-Konstrukten wurde pMM074 oder pMM075 als Ausgangsplasmid verwendet und an der entsprechenden Position mithilfe des *QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit* mutiert.

Tab. 2.2: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide

Plasmid	Ausgangsplasmid	Bezeichnung	Referenz/Quelle
pTX227	pRS416	Der1	E. Jarosch, 2006
pTX301	pRS416	Usa1	E. Jarosch, 2007
pSH131	pRS426-CUP	Usa1 (1-535)	S. Horn, 2008
pSH133	pRS426-CUP	Usa1 (584-838)	S. Horn, 2008
pSH150	pRS426-CUP	Usa1 (Δ 259-312)	S. Horn, 2008
pTX228	pRS416	Der1 (R17L)	E. Jarosch, 2007
pTX230	pRS416	Der1 (C23L)	E. Jarosch, 2007
pTX231	pRS416	Der1 (N73L)	E. Jarosch, 2007
pMM001	pRS406	Der1 (N73L)	diese Arbeit
pTX298	pRS416	Hrd1-13xMyc	E. Jarosch, 2007
pTX276	pRS416	Hrd1	C. Volkwein, 2007
pTX339	pRS415	PrA*	E. Jarosch, 2008
pGK1-pBpa		3SUP4-tRNA _{CUA} für pBpa-Inkorporation	Chen et al., 2007 [96]
pMM012	pRS416	Der1 (T16A)	diese Arbeit
pMM013	pRS416	Der1 (S70A)	diese Arbeit
pMM014	pRS416	Der1 (LEN84-86AAA)	diese Arbeit
pMM015	pRS416	Der1 (R91A)	diese Arbeit
pMM016	pRS416	Der1 (Y128A)	diese Arbeit
pMM017	pRS416	Der1 (P154A)	diese Arbeit
pMM020	pRS416	Der1 (GH179/180LA)	diese Arbeit
pMM021	pRS416	Der1 (YY183/184AA)	diese Arbeit
pMM022	pRS416	Der1 (DD186/187AA)	diese Arbeit
pMM023	pRS416	Der1 (P201A)	diese Arbeit
pMM033	pRS426	Dfm1-Der1C	diese Arbeit
pMM034	pRS426	Der1-Dfm1C	diese Arbeit
pMM040	pRS406	Der1 (R17LC23LN73L)	diese Arbeit
pMM041	pRS406	Der1 (R17LN73L)	diese Arbeit

Plasmid	Ausgangsplasmid	Bezeichnung	Referenz/Quelle
pMM043	pRS416	Der1 (R17LC23L)	diese Arbeit
pMM044	pRS416	Der1 (R17LN73L)	diese Arbeit
pMM046	pRS416	Der1 (K50A)	diese Arbeit
pMM047	pRS416	Der1 (R55A)	diese Arbeit
pMM048	pRS416	Der1 (Y58L)	diese Arbeit
pMM049	pRS416	Der1 (Q52A)	diese Arbeit
pMM050	pRS414	Hrd1-Usa1C	diese Arbeit
pMM051	pRS416	Hrd1-Usa1C	diese Arbeit
pMM052	pRS416	Der1 (S77L)	diese Arbeit
pMM053	pRS416	Der1 (S59L)	diese Arbeit
pMM054	pRS416	Der1 (P37A)	diese Arbeit
pMM055	pRS416	Der1 (G38W)	diese Arbeit
pMM056	pRS416	Der1 (D45A)	diese Arbeit
pMM057	pRS416	Der1 (L46A)	diese Arbeit
pMM058	pRS416	Der1 (K49A)	diese Arbeit
pMM064	pRS416	Der1-1xHA	diese Arbeit
pMM074	pRS425-CUP	Der1 (R17LN73L)-13xMyc	diese Arbeit
pMM075	pRS425-CUP	Der1-13xMyc	diese Arbeit

2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide, die zur Generierung von pBpa-markierten Der1-Konstrukten verwendet wurden, sind in der Tab. 2.3 nicht aufgelistet. Diese Oligonukleotide wurden mithilfe des *QuikChange Primer Design*-Programms erstellt, wobei das Codon der Aminosäure, die durch pBpa ersetzt werden sollte, zum Stop-Codon TAG mutiert wurde.

Tab. 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/Quelle
MM001	N-tag_Der1_fw	5'-G CAG AGA TTT CGT CAC CAA CAG AAG AAA AGC TAA AGC CCA AGC AAT ATG TGC AGG TCG ACA ACC CTT AAT-3'	diese Arbeit
MM002	N-tag_Der1_rv	5'-TGT GAC CAA AGG AAT GTC GCC TAA GAG ATT CAG TAT TAC AGC ATC GCG GCC GCA TAG GCC ACT-3'	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/ Quelle
MM038	Der1_300bp_up_fw	5'-GCA AGA GTA TCC GTT TTT AT-3'	diese Arbeit
MM039	Der1_300bp_down_rv	5'-CAA CGA TCA TAC ACC AGG-3'	diese Arbeit
MM040	Dfm1_300bp_up_fw	5'-GGT GTG AAC AGC CAT AGC-3'	diese Arbeit
MM041	Dfm1_300bp_down_rv	5'-CTC ATG CTC GTC TTC-3'	diese Arbeit
MM042	Der1-Dfm1 C-term_fw	5'-TAT AAG CGT AGC TGG GGG ATG ATA TCC AGA AAA GCT-3'	diese Arbeit
MM043	Der1-Dfm1 C-term_rv	5'-TAT CAT CCC CCA GCT ACG CTT ATA TAC AAA ATA-3'	diese Arbeit
MM044	Dfm1-Der1 C-term_fw	5'-CTG GGG CCA ATA TGG TTA GAA ATT GCC ATG AAT-3'	diese Arbeit
MM045	Dfm1-Der1 C-term_rv	5'-AAT TTC TAA CCA TAT TGG CCC CAG TGT ATG GGT-3'	diese Arbeit
MM058	Der1_T16A_MscI_fw	5'-TCT CTT AGG CGA CAT TCC TTT GGT GGC CAG ATT ATG GAC AAT TGG C-3'	diese Arbeit
MM059	Der1_T16A_MscI_rv	5'-GCC AAT TGT CCA TAA TCT GGC CAC CAA AGG AAT GTC GCC TAA GAG A-3'	diese Arbeit
MM060	Der1_Q52A_fw	5'-CAG TTA TGA TTT AGT ATT CAA AAA GGG AGC ATA TGG AAG ACT ACT TTA TTC GAT ATT C-3'	diese Arbeit
MM061	Der1_Q52A_rv	5'-GAA TAT CGA ATA AAG TAG TCT TCC ATA TGC TCC CTT TTT GAA TAC TAA ATC ATA ACT G-3'	diese Arbeit
MM062	Der1_R55A_fw	5'-GAT TTA GTA TTC AAA AAG GGA CAA TAT GGA GCA CTA CTT TAT TCG ATA TTC GAT TAC G-3'	diese Arbeit
MM063	Der1_R55A_rv	5'-CGT AAT CGA ATA TCG AAT AAA GTA GTG CTC CAT ATT GTC CCT TTT TGA ATA CTA AAT C-3'	diese Arbeit
MM064	Der1_S70A_fw	5'-TTC GAT TAC GGC GCA TTT AAT TGG ATA GCC ATG ATA AAC ATC TTT G-3'	diese Arbeit
MM065	Der1_S70A_rv	5'-CAA AGA TGT TTA TCA TGG CTA TCC AAT TAA ATG CGC CGT AAT CGA A-3'	diese Arbeit
MM066	Der1_LEN84-86AAA_fw	5'-CAT CTT TGT CAG CGC TAA TCA CTT ATC AAC TGC GGC AGC CTC ATT CAA TCT GAG AAG AAA ATT CTG TTG G-3'	diese Arbeit
MM067	Der1_LEN84-86_rv	5'-CCA ACA GAA TTT TCT TCT CAG ATT GAA TGA GGC TGC CGC AGT TGA TAA GTG ATT AGC GCT GAC AAA GAT G-3'	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/ Quelle
MM068	Der1_R91A_ MscI_fw	5'-CTT ATC AAC TTT GGA AAA CTC ATT CAA TCT GGC AAG AAA ATT CTG TTG GAT AAT ATT TTT ACT G-3'	diese Arbeit
MM069	Der1_R91A_ MscI_rv	5'-CAG TAA AAA TAT TAT CCA ACA GAA TTT TCT TGC CAG ATT GAA TGA GTT TTC CAA AGT TGA TAA G-3'	diese Arbeit
MM070	Der1_Y128A_ fw	5'-GTT ATT GCA TGA GAA TCT CGT GGC CTA CGA ACT GAA AAA GAA CGG A-3'	diese Arbeit
MM071	Der1_Y128A_ rv	5'-TCC GTT CTT TTT CAG TTC GTA GGC CAC GAG ATT CTC ATG CAA TAA C-3'	diese Arbeit
MM072	Der1_P154A_ fw	5'-TTG ATG TTT CAC CAT CTA TAT TCG CAA TCT ACA TGA ATG CAG TAA TG-3'	diese Arbeit
MM073	Der1_P154A_ rv	5'-CAT TAC TGC ATT CAT GTA GAT TGC GAA TAT AGA TGG TGA AAC ATC AA-3'	diese Arbeit
MM074	Der1_GH179/ 180LA_fw	5'-GTA GCT GGT TAG AAA TTG CCA TGA ATT TCA TGC CAC TAG CCG TAA TTT ACT ACA TGG ATG ATA TAA T-3'	diese Arbeit
MM075	Der1_GH179/ 180LA_rv	5'-ATT ATA TCA TCC ATG TAG TAA ATT ACG GCT AGT GGC ATG AAA TTC ATG GCA ATT TCT AAC CAG CTA C-3'	diese Arbeit
MM076	Der1_YY183/ 184AA_fw	5'-GCC ATG AAT TTC ATG CCA GGT CAC GTA ATT GCC GCC ATG GAT GAT ATA ATA GGG AAG ATT T-3'	diese Arbeit
MM077	Der1_YY183/ 184AA_rv	5'-AAA TCT TCC CTA TTA TAT CAT CCA TGG CGG CAA TTA CGT GAC CTG GCA TGA AAT TCA TGG C-3'	diese Arbeit
MM078	Der1_DD186/ 187AA_fw	5'-CAG GTC ACG TAA TTT ACT ACA TGG CTG CTA TAA TAG GGA AGA TTT ATG GCA T-3'	diese Arbeit
MM079	Der1_DD186/ 187AA_rv	5'-ATG CCA TAA ATC TTC CCT ATT ATA GCA GCC ATG TAG TAA ATT ACG TGA CCT G-3'	diese Arbeit
MM080	Der1_P201A_ fw	5'-ATG GCA TCG ATT TGT GTA AAT CTG CGT ACG ACT GGT-3'	diese Arbeit
MM081	Der1_P201A_ rv	5'-ACC AGT CGT ACG CAG ATT TAC ACA AAT CGA TGC CAT-3'	diese Arbeit
MM109	Der1_R17L_fw	5'-GCG ACA TTC CTT TGG TCA CAT TAT TAT GGA CAA TTG GCT GTC-3'	diese Arbeit
MM110	Der1_R17L_rv	5'-GAC AGC CAA TTG TCC ATA ATA ATG TGA CCA AAG GAA TGT CGC-3'	diese Arbeit
MM111	Der1_C23L mit R17L_fw	5'-CAC ATT ATT ATG GAC AAT TGG CTT ACT TGT ACT ATC AGG TCT CAC AAG-3'	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/ Quelle
MM112	Der1_C23L mit R17L_rv	5'-CTT GTG AGA CCT GAT AGT ACA AGT AAG CCA ATT GTC CAT AAT AAT GTG-3'	diese Arbeit
MM115	Der1_R55L_fw	5'-GAT TTA GTA TTC AAA AAG GGA CAA TAT GGA TTA CTA CTT TAT TCG ATA TTC GAT TAC G-3'	diese Arbeit
MM116	Der1_R55L_rv	5'-CGT AAT CGA ATA TCG AAT AAA GTA GTA ATC CAT ATT GTC CCT TTT TGA ATA CTA AAT C-3'	diese Arbeit
MM117	Der1_S59L_fw	5'-GAC AAT ATG GAA GAC TAC TTT ATT TGA TAT TCG ATT ACG GCG CAT-3'	diese Arbeit
MM118	Der1_S59L_rv	5'-ATG CGC CGT AAT CGA ATA TCA AAT AAA GTA GTC TTC CAT ATT GTC-3'	diese Arbeit
MM119	Der1_S77L_fw	5'-ATT GGA TAT CCA TGA TAA ACA TCT TTG TCC TAG CTA ATC ACT TAT CAA CTT TGG AAA ACT C-3'	diese Arbeit
MM120	Der1_S77L_rv	5'-GAG TTT TCC AAA GTT GAT AAG TGA TTA GCT AGG ACA AAG ATG TTT ATC ATG GAT ATC CAA T-3'	diese Arbeit
MM125	Der1_Y58L_fw	5'-AAA AGG GAC AAT ATG GAA GAC TAC TTT TAT CGA TAT TCG ATT ACG GCG-3'	diese Arbeit
MM126	Der1_Y58L_rv	5'-CGC CGT AAT CGA ATA TCG ATA AAA GTA GTC TTC CAT ATT GTC CCT TTT-3'	diese Arbeit
MM136	Der1_EcoRI_fw	5'-GAA TTC ATG GAT GCT GTA ATA CTG AAT CTC-3'	diese Arbeit
MM137	Hrd1_BglI_1331bp_fw	5'-AGA TCT ACT TCC CAC AAG-3'	diese Arbeit
MM138	Hrd1-Usa1_C-term_fw	5'-ATC CAG CAT ATC GCT GGT AAT ACC CAA GAG GTG TGG AAT TTA TGG C-3'	diese Arbeit
MM139	Hrd1-Usa1_C-term_rv	5'-CTC TTG GGT ATT ACC AGC GAT ATG CTG GAT AAA TTT ATC TGG TAT G-3'	diese Arbeit
MM140	Usa1_C-term_XhoI_rv	5'-CTC GAG TTA GTC TTC ATC AGG AAT G-3'	diese Arbeit
MM161	Der1_SacI_500bp_up_fw	5'-GAG CTC GAA CAC TGA GCT TAC GTA ACC GC-3'	diese Arbeit
MM162	Der1_XhoI_70bp_down_rv	5'-CTC GAG GGC CTA TTT TAT ATG TAG TTA TTT ATG C-3'	diese Arbeit
MM165	Der1_del_F1_fw	5'-GAT TTC GTC ACC AAC AGA AGA AAA GCT AAA GCC CAA GCA ATC GGA T CC CCG GGT TAA TTA A-3'	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/ Quelle
MM166	Der1_ <i>Longtine</i> _F2_fw	5'-GTA AAT CTC CGT ACG ACT GGT TCC GCA ACA CTG AAA CAC CCC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	diese Arbeit
MM167	Der1_ <i>Longtine</i> _R1_rv	5'-CAC TTT TGT TAT TGG TTT TTG GTA AAT AAA AAC GGC CTT TCC TGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC-3'	diese Arbeit
MM172	Der1_ <i>HindIII</i> _fw	5'-AAG CTT ATG GAT GCT GTA ATA CTG AAT CTC-3'	diese Arbeit
MM175	Usa1_Δ319_fw	5'-AAT GAT ATC AAG TTG ATT TAT AAG GGA CAG TTG CTT CAT GAA AAT TGC AGG TCG ACA ACC CTT AAT-3'	diese Arbeit
MM176	Usa1_Δ418_rv	5'-TAG TTC GCT AAC AGG AAT GAA TAC TAC TTC ATC CCC GTT GAT AAT GCG GCC GCA TAG GCC ACT-3'	diese Arbeit
MM177	Usa1_Δ372_fw	5'-GAA GTG TTC AAC AAT CCG AAT ATT TTC CAA TTC ATG CCT CCA GAT TGC AGG TCG ACA ACC CTT AAT-3'	diese Arbeit
MM178	Der1 K50A_fw	5'-GTA CAG TTA TGA TTT AGT ATT CAA AGC GGG ACA ATA TGG AAG ACT AC-3'	diese Arbeit
MM179	Der1 K50A_rv	5'-GTA GTC TTC CAT ATT GTC CCG CTT TGA ATA CTA AAT CAT AAC TGT AC-3'	diese Arbeit
MM184	Der1_ <i>HindIII</i> _500bp_up_fw	5'-AAG CTT GAA CAC TGA GCT TAC GTA ACC GC-3'	diese Arbeit
MM190	Der1_618bp_seq_rv	5'-GGG TGT TTC AGT GTT G-3'	diese Arbeit
MM191	Der1_499bp_seq_fw	5'-GCG TAG CTG GTT AGA-3'	diese Arbeit
MM255	Usa1_del_F1_ <i>Longtine</i> _fw	5'-CTA TAT AAA GTG TCA TAT ACA CCC TTC ACC AAA TAC GCA ACC GGA T CC CCG GGT TAA TTA A-3'	diese Arbeit
MM256	Usa1_R1_ <i>Longtine</i> _rv	5'-CCT TAA ACG CAT TAT ATA ACG TGG CCA CAT CGC ATT GCA AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC-3'	diese Arbeit
MM286	Der1 G38W_ <i>Styl</i> _fw	5'-GTC TCC GGA TTG TGG ATC CAT GGA AGG TAG TGT A-3'	diese Arbeit
MM287	Der1 G38W_ <i>Styl</i> _rv	5'-TAC ACT ACC TTC CAT GGA TCC ACA ATC CGG AGA C-3'	diese Arbeit
MM294	Der1_P37A_ <i>Sall</i> _fw	5'-GTC TCC GGA TTG TCG ACG CAG GGA AGG TAG-3'	diese Arbeit
MM295	Der1_P37A_ <i>Sall</i> _rv	5'-CTA CCT TCC CTG CGT CGA CAA TCC GGA GAC -3'	diese Arbeit

Oligo-nukleotid	Bezeichnung	Sequenz	Referenz/ Quelle
MM296	Der1_D45A_ Styl_fw	5'-GGG AAG GTA GTG TAC AGT TAT GCC TTG GTA TTC AAA AAG GGA CAA-3'	diese Arbeit
MM297	Der1_D45A_ Styl_rv	5'-TTG TCC CTT TTT GAA TAC CAA GGC ATA ACT GTA CAC TAC CTT CCC-3'	diese Arbeit
MM298	Der1_L46A_ XmaI_fw	5'-CCC GGG AAG GTA GTG TAC AGT TAT GAT GCA GTA TTC AAA AAG GGA CAA TA-3'	diese Arbeit
MM299	Der1_L46A_ XmaI_rv	5'-TAT TGT CCC TTT TTG AAT ACT GCA TCA TAA CTG TAC ACT ACC TTC CCG GG 3'	diese Arbeit
MM300	Der1_K49A_ Styl_fw	5'-GGA AGG TAG TGT ACA GTT ATG ATT TAG TAT TCG CCA AGG GAC AAT ATG GAA GAC-3'	diese Arbeit
MM301	Der1_K49A_ Styl_rv	5'-GTC TTC CAT ATT GTC CCT TGG CGA ATA CTA AAT CAT AAC TGT ACA CTA CCT TCC-3'	diese Arbeit
RG068	Hrd3 del_fw	5'-TTT CAC CGT GAC TCT TTA ACC CCT GCC GAA TAT TAT AAG CAA ACT CAG CTG AAG CTT CGT ACG C-3'	R. Gauss, 2004
RG069	Hrd3 del_rv	5'-GGT GAT TTC TAT GGA TAG TCT ATG TAT ATA TCT ATA CAA ACC ACA CGA TAG GCC ACT AGT-3'	R. Gauss, 2004

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Der α -Ubiquitin-Antikörper wurde in 2 % (w/v) BSA/TBT angesetzt, während alle anderen Antikörper in 5 % (w/v) Magermilch/TBT verdünnt wurden.

Tab. 2.4: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten primären Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Referenz/Quelle
Kaninchen- α -Der1	1:200	Horn et al., 2009 [55]
Kaninchen- α -Hrd1	1:50000	Horn et al., 2009 [55]
Kaninchen- α -Hrd3	1:2500	Gauss et al., 2006 [35]
Kaninchen- α -Usa1 (C-Terminus)	1:1000	Horn et al., 2009 [55]
Kaninchen- α -Usa1 (N-Terminus)	1:20000	Horn et al., 2009 [55]

Bezeichnung	Verdünnung	Referenz/Quelle
Kaninchen- α -Kar2	1:40000	T.A. Rapoport-Labor
Kaninchen- α -Yos9	1:300	F. Zimmermann, 2011
Kaninchen- α -Sec61	1:20000	Biederer et al., 1996 [97]
Maus- α -CPY (A6428)	1:2000	Invitrogen
Maus- α -HA (H9658)	1:10000	Sigma
Kaninchen- α -HA	1:100	Santa Cruz
Maus- α -Myc (M5546)	1:5000	Sigma
Kaninchen- α -Myc	1:100	Santa Cruz
Kaninchen- α -Ubiquitin (UG9510)	1:1000	Enzo Life Sciences

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.5: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten sekundären Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Referenz/Quelle
Maus-IgG HRP-konjugiert (A9044)	1:10000	Sigma
Kaninchen-IgG HRP-konjugiert (A0545)	1:10000	Sigma

2.1.11 verwendete Puffer und Medien

2.1.11.1 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium	1 % (w/v) Bacto™ Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5
LB-Amp-Medium	LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin
LB-Kan-Medium	LB-Medium; 25 µg/ml Kanamycin
X-Gal/IPTG-Kulturplatten	LB-Ampicillin-Agar-Platte; 1 mM IPTG; 400 µM X-Gal

SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto™ Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,4 % (w/v) D-Glukose; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 2,5 mM KCl; pH 7,4
------------	---

2.1.11.2 Medien für Hefekulturen

YPD-Vollmedium	2 % (w/v) Bacto™ Pepton; 1 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 2 % D-Glukose; pH 5,5
SD-Minimalmedium	0,67 % (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren; 2 % (w/v) D-Glukose; 20 mg/l L-Histidin; 30 mg/l L-Leucin; 30 mg/l L-Lysin; 20 mg/l L-Tryptophan; 20 mg/l Adeninsulfat; 20 mg/l Uracil
5-FOA-Medium	SD-Minimalmedium; 70 mg/l Uracil; 1 mg/ml 5-FOA
YPD-G418	YPD-Vollmedium; 200 mg/l G418
<i>Chase</i> -Medium	SD-Minimalmedium; 3,3 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,013 % (w/v) L-Methionin; 0,01 % (w/v) L-Cystein
PräSpo-Medium	0,8 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,3 % (w/v) Bacto® Pepton; 10 % (w/v) Glukose
Spo-Medium	0,1 % (w/v) Bacto™ <i>Yeast Extract</i> ; 0,05 % (w/v) Glukose; 1 % (w/v) KOAc
SED-Medium	18,2 % (w/v) Sorbit; 25 mM EDTA

2.1.11.3 Puffer und Lösungen für molekular- und zellbiologische Methoden

DNA-Präp-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS; 2 % (v/v) Triton X-100
5x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA; 1,25 % (w/v) OrangeG

Mini-Lösung A	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNaseA; pH 8,0
Mini-Lösung B	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
Mini-Lösung C	3,2 M KOAc (pH 5,5); 11,5 % (v/v) Essigsäure
NGF-Mix	1 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 8 U/ μ l NGF in IP (0,02)-Puffer
pBpa-Stocklösung	0,4 M pBpa; 1 M NaOH
50x TAE	2 M Tris/HCl; 7 % (v/v) Essigsäure; 50 mM EDTA; pH 8,2
10x TE-Puffer	100 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH 7,4
Trafo-Lösung A	100 mM LiOAc; 1x TE (pH 7,5)
Trafo-Lösung B	100 mM LiOAc; 1x TE (pH 7,5); 40 % (w/v) PEG 3350

2.1.11.4 Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250
Harnstoff-Probenpuffer	8 M Harnstoff; 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 0,1 mM EDTA; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 1,5 % (w/v) DTT
IP15-Puffer (1,2x)	60 mM Tris/HCl; 480 mM KOAc; 1,2 mM EDTA; 12 % (v/v) Glycerol; pH 7,5
IP15 (0,5 % (w/v) Digitonin)-Puffer	50 mM Tris/HCl; 400 mM KOAc; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (w/v) Digitonin; pH 7,5
IP32-Puffer	50 mM HEPES; 50 mM NaCl; 125 mM KOAc; 2 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 1 mM EDTA; 10 μ M CaCl_2 ; 3 % (v/v) Glycerol; pH 7,5
IP32 (0,5 % (v/v) NP40)-Puffer	50 mM HEPES; 50 mM NaCl; 125 mM KOAc; 2 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 1 mM EDTA; 10 μ M CaCl_2 ; 3 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (v/v) NP40; pH 7,5

IP (0,1)-Puffer	50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS; pH 7,5
IP (0,02)-Puffer	50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,02 % (w/v) SDS; pH 7,5
IP-Verdünnungspuffer	50 mM Tris/HCl; 165 mM NaCl; 5,5 mM EDTA; 1,1 % (v/v) Triton X-100; pH 7,5
Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 % (w/v) SDS
Membran-Präp-Puffer	50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 7,5
PBS (10x)	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 101 mM Na ₂ HPO ₄ ; 18 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
PBS-Brij	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,2 % (w/v) Brij; pH 7,5
SDS-PAGE-Sammelgel	3 % (v/v) Acrylamid; 0,15 % (v/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1 (v/v) % SDS; 0,25 % (v/v) TEMED; 2,5 % (v/v) APS
SDS-PAGE-Trenngel (12 %)	12 % (v/v) Acrylamid; 0,09 % (v/v) Bisacrylamid; 500 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1 (v/v) % SDS; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS
2x SDS-Probenpuffer (nach Laemmli)	135 mM Tris/HCl (pH 6,8); 20 % (v/v) Glycerol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 200 mM DTT
2x SDS-Probenpuffer (pH 8)	135 mM Tris/HCl (pH 8,0); 20 % (v/v) Glycerol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 200 mM DTT
3x SDS-Probenpuffer	203 mM Tris/HCl (pH 6,8); 30 % (v/v) Glycerol; 6 % (w/v) SDS; 0,075 % (w/v) Bromphenolblau; 300 mM DTT

Material und Methoden

5x SDS-PAGE-Laufpuffer	1,5 % (w/v) Tris-Base; 7,2 % (w/v) Glycin; 0,5 % (w/v) SDS
Sorbitol-Puffer	0,7 M Sorbitol; 50 mM Tris/HCl; pH 7,5
Sorbitol-Ub-Puffer	0,7 M Sorbitol; 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS; pH 7,5
10x TBT	500 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl; 1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5
Western-Blot-Transferpuffer	1,1 % (w/v) Glycin; 0,24 % (w/v) Tris-Base; 25 % (v/v) Methanol; 0,01 % (w/v) SDS

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen

Für die Isolierung genomischer DNA wurden 5-10 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen bei einer optischen Dichte von 1,0 OD₆₀₀ bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml ddH₂O gewaschen, bevor es in 200 µl DNA-Präp-Puffer aufgenommen wurde. Nach der Zugabe von 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs wurde die Zellsuspension zur mechanischen Lyse mit Glasperlen versetzt und durch heftiges Schütteln im Vibrax für 4 min bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend mit 200 µl 1x TE (pH 8)-Puffer verdünnt und zur Phasentrennung bei 10000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 10 min zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml 100 % (v/v) Ethanol vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 5 min wurde das Präzipitat in 400 µl 1x TE (pH 8)-Puffer resuspendiert. Es folgte ein RNA-Verdau mit 40 µg RNase A bei 37 °C für 5 min. Im Anschluss wurde die genomische DNA durch Zugabe von 100 mM Ammoniumacetat und 1 ml 100 % (v/v) Ethanol gefällt und durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 5 min präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und schließlich in 100 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung einer analytischen PCR wurde die Taq DNA-Polymerase verwendet, die jedoch aufgrund einer fehlenden Korrekturlesefunktion eine relativ hohe Fehlerrate bei der Amplifizierung aufweist. In PCR-Reaktionen, in denen längere DNA-Fragmente mit einer höheren Genauigkeit amplifiziert werden sollten, wurde die DNA-Polymerase des *Expand-High Fidelity PCR System* eingesetzt. Diese ist wie die Taq DNA-Polymerase in der Lage, matrizenunabhängig ein Desoxyadenosin an den jeweiligen 3'-Enden des amplifizierten DNA-Fragments anzuhängen. Für das Einfügen von Punktmutationen in eine DNA-Sequenz wurde die *Pfu Ultra™ HF* DNA-Polymerase eingesetzt, die im Vergleich zur DNA-Polymerase des *Expand High Fidelity PCR System* eine noch höhere Prozessivität und Genauigkeit besitzt.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 25 µl oder 50 µl mit den für die DNA-Polymerasen geeigneten Puffern. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die verwendeten PCR-Programme sind im Anhang dargestellt. Für die Anlagerung

der Oligonukleotide an die DNA-Matrize wurde in Abhängigkeit des eingesetzten Oligonukleotids eine Hybridisierungstemperatur zwischen 49 °C und 53 °C gewählt. Die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tab.: 2.3 aufgelistet.

2.2.1.3 Punktmutagenese von DNA-Sequenzen

Das Einfügen von Punktmutationen erfolgte mit der *Pfu Ultra™ HF* DNA-Polymerase nach den Herstellerangaben des *QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit*.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 0,5-2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und auf 50 °C abgekühlt. Anschließend wurde die Agaroselösung zur Anfärbung der DNA mit dem Fluorophor *RedSafe* versetzt, das doppelsträngige DNA bindet und ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei $\lambda = 309 \text{ nm}$ aufweist. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und die Agarose-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 110 V für 15-30 min in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit einem UV-Transilluminator.

2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu extrahierende DNA-Fragment wurde nach einer Agarose-Gelelektrophorese unter einer niederenergetischen UV-Lampe mithilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion des DNA-Fragments aus dem Agarosegel erfolgte nach den Herstellerangaben des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau-Ansätze wurden nach den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme zusammengesetzt. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 1 µg DNA eingesetzt und für 1 h bei der für die enzymatische Aktivität optimalen Temperatur inkubiert. Ein präparativer Verdau wurde mit 5 µg DNA für 2 h bei der entsprechenden

Temperatur durchgeführt. Danach wurde der Ansatz des präparativen Verdaus über eine Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion aufgereinigt.

2.2.1.7 Transformation von *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden mithilfe einer Elektroporation transformiert. Hierzu wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Im Fall einer Ligation mit dem pGEM®-T *Easy*-Vektor wurden 3 µl des Ligationsansatzes verwendet, während bei einer gewöhnlichen Klonierung 10 µl eines zuvor dialysierten Ligationsansatzes eingesetzt wurden. Nach dem Überführen der Bakteriensuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette wurde bei 2,5 MV und 25 µF der Elektropuls durchgeführt. Zur Regeneration wurde der Transformationsansatz in 500 µl warmes SOC-Medium aufgenommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Handelte es sich um eine gewöhnliche Klonierung, so wurden 100-200 µl der transformierten Bakterienzellen auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Bei Verwendung des pGEM®-T *Easy*-Vektors wurden für eine Blau/Weiß-Selektion 50 µl der Zellsuspension auf IPTG/X-Gal-beschichtete Platten ausgestrichen.

2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5 ml LB-Ampicilin und/oder Kanamycin-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Bakterienkultur bei 21000 x g für 30 s abzentrifugiert und in 150 µl Mini-Lösung A gründlich resuspendiert bis keine Pelletrückstände mehr sichtbar waren. Es folgte die Bakterienlyse durch Zugabe von 150 µl Mini-Lösung B und vorsichtiges dreimaliges Invertieren der Zellsuspension. Danach wurden zur Fällung der Proteine 150 µl Mini-Lösung C zugegeben und die gefällten Proteine bei 21000 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100 % (v/v) Ethanol gefällt. Durch eine erneute Zentrifugation bei 21000 x g wurde die gefällte DNA pelletiert und anschließend mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das bei RT getrocknete DNA-Pellet wurde in 50 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration bei 260 nm photometrisch bestimmt.

2.2.1.9 Sicherung von PCR-Fragmenten

Die Sicherung von PCR-Fragmenten erfolgte durch eine Klonierung in den Vektor pGEM®-T *Easy*, der bereits linearisiert und von kohäsiven Enden flankiert ist, die aus dT-Überhängen bestehen. Die dT-Überhänge des Vektors ermöglichen eine direkte Integration von DNA-Fragmenten, die mit der Taq DNA-Polymerase oder dem *Expand High Fidelity PCR System* amplifiziert wurden und daher jeweils einen dA-Überhang pro Einzelstrang besitzen. Für die Ligation wurden 2 µl eines PCR-Ansatzes mit 25 ng pGEM®-T *Easy*-Vektor, 5 µl 2x *Rapid Ligation*-Puffer und 3 U T4 DNA-Ligase versetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurden 3 µl des Ligationsansatzes für eine Transformation in *E. coli* XL1-Blue verwendet und die Integration des DNA-Fragments mithilfe einer Blau/Weiß-Selektion überprüft.

2.2.1.10 Allgemeine Klonierungsstrategie

Unter Verwendung bestimmter Oligonukleotide wurde zunächst die DNA-Sequenz des zu klonierenden Gens durch eine PCR mit dem *Expand High Fidelity PCR System* amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA aus *S. cerevisiae* oder Plasmid-DNA. Anschließend wurde das DNA-Fragment (*insert*) in den pGEM®-T *Easy*-Vektor subkloniert. Da über die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide bestimmte Restriktionsschnittstellen angefügt worden waren, konnte das PCR-Produkt mittels Restriktionsendonukleasen aus dem pGEM®-T *Easy*-Vektor herausgeschnitten und schließlich in den Zielvektor integriert werden. Hierzu wurde der Zielvektor ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit dem *insert* ligiert. Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis *insert* zu Vektor von 3:1 gewählt. Der Ligationsansatz setzte sich daher aus der entsprechenden Menge des zu klonierenden DNA-Fragments und des Zielvektors, 2 µl 10x T4 DNA Ligase-Puffer und 1 U T4 DNA-Ligase zusammen. Der Ansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor einer Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurde der gesamte Ligationsansatz mittels einer Dialysemembran für 30 min in einer Petrischale (Ø 100 mm) gegen ddH₂O dialysiert. Anschließend wurden 10 µl des dialysierten Ligationsansatzes für die Transformation eingesetzt.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden zunächst mithilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurden

mindestens 250 ng der aufgereinigten DNA-Probe für die Sequenzierung eingesetzt, die von der Firma STRATEC Molecular GmbH durchgeführt wurde.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Gesamtzellaufschluss

5-10 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 1,0 OD₆₀₀ bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl kaltem Lyse-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte der Aufschluss der Hefezellen durch eine mechanische Lyse. Hierzu wurde die Zellsuspension mit Glasperlen aufgefüllt, bis noch eine dünne Flüssigkeitsschicht über den Glasperlen zu erkennen war. Anschließend wurden die Zellen durch heftiges Schütteln im Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min aufgeschlossen. Das Lysat wurde zur Denaturierung der Proteine mit 100 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C erhitzt. Um das Lysat von den Glasperlen und dem Zelldebris abzutrennen, wurde die Probe bei 2000 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Analyse der Probe erfolgte in der Regel durch eine Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Abschn. 2.2.2.3) und einen anschließenden Immunoblot (Abschn. 2.2.2.4).

2.2.2.2 Isolierung von Membranen aus Hefezellen

5-10 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 1,0 OD₆₀₀ durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min pelletiert und danach in 200 µl kaltem Membran-Präp-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend wie in Abschn. 2.2.2.1 mechanisch mit Glasperlen aufgeschlossen und das Lysat mit 1 ml Membran-Präp-Puffer verdünnt. Zur Abtrennung des Zelldebris und der Glasperlen folgte eine Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 3 min. 1 ml des Überstands wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Membranen durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 20 min angereichert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Membranen in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 65 °C im Thermoschüttler erhitzt. Die Analyse der Probe erfolgte in der Regel mittels SDS-PAGE und Immunoblot.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde das mit Probenpuffer versetzte Proteingemisch in einem 3 %igem Sammelgel aufkonzentriert, bevor die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte. Dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine entsprechend wurden 9-18 %ige Trenngele verwendet. Zum Einlaufen des Proteingemischs in das Sammelgel wurde die Gelelektrophorese bei 80 V für 20 min und dann zur Auftrennung der Proteine bei 120 V für 90 min durchgeführt. Für eine direkte Anfärbung der Proteine wurde das Gel für 30 min mit Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mit ddH₂O entfärbt. Eine spezifische Detektion von Proteinen erfolgte im Anschluss an die SDS-PAGE durch einen Immunoblot.

2.2.2.4 Immunoblot (*Western-Blotting*)

Zur Immobilisierung und Detektion bestimmter Proteine nach einer SDS-PAGE wurde ein Immunoblot durchgeführt, für den eine *Tank-Blot*-Apparatur verwendet wurde. Hierbei wurde zunächst ein in Western-Blot-Transferpuffer getränktes *Whatman*-Papier mit einem SDS-Polyacrylamidgel belegt. Dieses wurde mit einer PVDF-Membran bedeckt, die zuvor für einige Sekunden in Methanol aktiviert wurde. Auf die PVDF-Membran wurde schließlich ein weiteres eingeweichtes *Whatman*-Papier gelegt. Die Anode wurde an die der Membran zugewandten Seite angeschlossen und der Proteintransfer bei 250 mA für 90 min durchgeführt. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran nach dem Proteintransfer mit einer 10 %igen (w/v) Magermilchlösung (in 1x TBT angesetzt) für 30 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in einem bestimmten Verhältnis mit 5 %iger (w/v) Magermilchlösung verdünnt und die Membran mit dieser Lösung über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x für jeweils 10 min mit PBS-Brij und 1 x für 10 min mit PBS gewaschen, bevor der Blot für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Dieser wurde zuvor im Verhältnis 1:10000 in 5 % (w/v) Magermilchlösung verdünnt. Danach wurde die Membran wieder 2 x 10 min in PBS-Brij und 1 x 10 min in PBS gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *ECL plus Western Blotting Detection System*.

2.2.2.5 Größenanalyse des Der1-Oligomers mittels Gelfiltration

Es wurden 100 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen bei einer optischen Dichte von 0,8-1,0 OD₆₀₀ durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 4 ml kaltem ddH₂O/1 mM PMSF gewaschen und dann in 800 µl IP15-Puffer (1x) aufgenommen. Der Aufschluss der Hefezellen erfolgte durch das Zufügen von Glasperlen und heftiges Schütteln im Vibrax für 3 min. Nach einer Verdünnung des Zellslysats mit 800 µl IP15-Puffer (1x) wurde durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min das Zelldebris zusammen mit den Glasperlen abgetrennt. 1 ml des Überstands wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Isolierung von Membranen bei 21000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Membranen wurden in 800 µl IP15 (1% (w/v) Digitonin)-Puffer aufgenommen und die Membranproteine durch eine Inkubation auf dem Drehrad bei 4 °C für 1 h solubilisiert. Restliche Membranbestandteile wurden durch eine erneute Zentrifugation bei 21000 x g für 20 min pelletiert, bevor schließlich 500 µl des Solubilisats in die Gelfiltrationsapparatur injiziert wurden. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200-Säule und IP15 (0,25 % (w/v) Digitonin)-Puffer als Laufpuffer verwendet. Es wurden 40 Fraktionen mit je 500 µl bei einer Flussrate von 1 ml/min gesammelt. Zur Analyse der Fraktionen wurden die Proteine nach Zugabe von 15 % (w/v) TCA bei 4 °C für 20 min gefällt und durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 20 min pelletiert. Das Proteinpellet wurde mit 1 ml Aceton gewaschen und bei RT getrocknet, bevor es in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer (pH 8) aufgenommen und bei 65 °C für 10 min im Thermoschüttler erhitzt wurde. Es folgte eine Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE und die Detektion der HRD-Ligase-Komponenten mithilfe spezifischer Antikörper im Immunoblot.

2.2.2.6 Nicht-denaturierende Immunopräzipitation (Ko-IP)

50-60 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 0,8-1,0 OD₆₀₀ durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min geerntet und anschließend mit 4 ml kaltem Wasser, das mit 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt und allen weiteren verwendeten Lösungen wurde 1 mM PMSF zugesetzt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und erneut bei 2000 x g für 3 min zentrifugiert. Darauf folgte die Resuspension des Zellpellets in 800 µl IP15-Puffer (1,2x). Zur mechanischen Lyse der Hefezellen wurde die Zellsuspension mit Glasperlen aufgefüllt, bis noch eine dünne Flüssigkeitsschicht über den Glasperlen zu erkennen war, und anschließend im Vibrax für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Das Lysat wurde mit 800 µl IP15-Puffer (1,2x) verdünnt und zur Abtrennung des Zelldebris bei 2000 x g für 3 min

zentrifugiert. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte durch das Detergenz Digitonin. Hierzu wurden 800 µl des Überstands in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl einer 5 %igen (w/v) Digitonin-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration des Digitonins bei der Solubilisierung 1 % (w/v) betrug. Die Proben wurden für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend bei 21000 x g für 20 min zentrifugiert, um restliche Membranbestandteile vom Solubilisat abzutrennen. 850 µl des Überstands wurden in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Verdünnung der Detergenzkonzentration auf 0,5 % (w/v) Digitonin mit 850 µl IP 15-Puffer (1x) versetzt. Weitere 50 µl des Solubilisats wurden als Kontrolle mit 50 µl 2x SDS-Probenpuffer versehen und für 10 min bei 65 °C im Thermoschüttler erhitzt. Zur Präzipitation von Proteinen wurden dem verdünnten Solubilisat 15 µl Protein A-Sepharose und 1 µl spezifischer Antikörper hinzugefügt. Die Inkubation mit der Sepharose-Matrix erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Am nächsten Tag wurde die Sepharose-Matrix zur Entfernung unspezifischer Bindungen zweimal mit 1 ml IP15 (0,5 % (w/v) Digitonin)-Puffer gewaschen und die Proteine durch Erhitzen bei 65 °C für 10 min in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer von der Matrix eluiert. Es wurden jeweils 10 µl des Solubilisats sowie des Eluats auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und danach die Proteine mithilfe eines Immunoblots detektiert.

Für eine Untersuchung der Substratwechselwirkung mit Komponenten der HRD-Ligase wurde die Durchführung der Ko-Immunopräzipitation in einigen Punkten abgeändert. So wurden 150 OD₆₀₀ Zellen bei einer optischen Dichte von 1,2 OD₆₀₀ für das Experiment verwendet. Des Weiteren wurde anstelle des IP15-Puffers der IP32-Puffer eingesetzt. Nach der Zellyse wurden zunächst Mikrosomen durch eine differentielle Zentrifugation bei 21000 x g bei 4 °C für 20 min präpariert und diese mit dem Detergenz NP40 in 1 ml IP32 (0,5 % (v/v) NP40)-Puffer solubilisiert. Nach einer Abtrennung der Membranreste durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 20 min erfolgte die Präzipitation der Proteine durch spezifische Antikörper an einer Protein A-Sepharose-Matrix in IP32 (0,5 % (v/v) NP40)-Puffer über Nacht. Für das Waschen der Sepharose-Matrix wurde ebenfalls IP32 (0,5 % (v/v) NP40)-Puffer verwendet.

2.2.2.7 Isolierung polyubiquitinierten Substrate aus Gesamtzellextrakt

Zur Isolierung und Detektion von ubiquitinierten Substraten wurden 150 OD₆₀₀ in YPD-Medium gewachsene Zellen bei einer optischen Dichte von 1,5 OD₆₀₀ durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min pelletiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und alle Lösungen mit 20 mM NEM versetzt, das Thiol-Gruppen von Aminosäureresten alkyliert und somit unter anderem als Inhibitor von Deubiquitinasen

wirkt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 4 ml einer Waschlösung resuspendiert, die neben 20 mM NEM auch 10 mM NaN_3 und 1 mM PMSF enthielt. Nach einer Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen und einer erneuten Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min wurde das Zellpellet in 800 μl Sorbitol-Ub-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von Glasperlen folgte eine mechanische Lyse der Hefezellen durch intensives Schütteln im Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min. Das Zelllysate wurde mit 600 μl Sorbitol-Ub-Puffer verdünnt und anschließend zur Abtrennung der Glasperlen und des Zelldebris bei 2000 x g für 3 min zentrifugiert. 1 ml des Überstands wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Zellyse und Solubilisierung der Membranen für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 21000 x g für 20 min, um restliche Membranbestandteile vom Solubilisat abzutrennen. Als Kontrolle wurden 50 μl des Überstands abgenommen mit 50 μl 2x SDS-Probenpuffer versehen. Weitere 850 μl des Überstands wurden mit 850 μl Sorbitol-Ub-Puffer verdünnt und das polyubiquitinierte Substrat mithilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert. Hierzu wurde das verdünnte Gesamtzellextrakt mit 15 μl Protein A-Sepharose und 1 μl Antikörper versetzt und im Anschluss über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Sepharose-Matrix zweimal mit 1 ml Sorbitol-Ub-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min in 50 μl 1x SDS-Probenpuffer eluiert. Zur Auftrennung des Proteingemischs wurden 10 μl des 1:10 verdünnten Totallysats und 20 μl des Eluats auf ein 9 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion des polyubiquitinierten Substrats erfolgte im Immunoblot mithilfe eines α -Ubiquitin-Antikörpers.

2.2.2.8 Detektion membranassoziierter polyubiquitinerter Substrate

Zunächst wurden 150 OD_{600} -Zellen bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit Sorbitol-Puffer, der neben 1 mM PMSF auch 20 mM NEM enthält, gewaschen. Zur Präparation von Mikrosomen wurden die Zellen nach dem Waschschrift in 800 μl Sorbitol-Puffer aufgenommen und durch eine mechanische Lyse im Vibrax aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde mit 600 μl Sorbitol-Puffer verdünnt und das Zelldebris durch eine Zentrifugation abgetrennt. Zur Präparation der Mikrosomen wurde 1 ml des Zelllysats in einer Ultrazentrifuge bei 86000 x g und 4 °C für 15 min (TLA 100.3 Rotor) zentrifugiert. 800 μl des Überstands wurden mit 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA und 150 mM NaCl versetzt und für 1 h auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die pelletierten Mikrosomen wurden in 1 ml Sorbitol-Ub-Puffer aufgenommen und ebenfalls unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte entsprechen den Abläufen in Abschn. 2.2.2.7.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Hefezellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind Derivate des Stamms YW01. Dieser Stamm ist auxotroph für verschiedene Aminosäuren und Nukleinsäuren, d.h. die Hefezellen sind nicht in der Lage, bestimmte Aminosäuren und Nukleinsäuren selber zu synthetisieren. Daher wurden Hefestämme, die kein Plasmid enthielten, in Vollmedium (YPD-Medium) als Flüssigkultur oder auf Agarplatten kultiviert. Während die Kultivierung einer Flüssigkultur im Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler erfolgte, wurden Agarplatten bei derselben Temperatur in einem Brutschrank inkubiert. Plasmide, die für die Transformation von Hefezellen verwendet wurden, enthielten einen bestimmten Auxotrophiemarker, wodurch ein auxotropher Defekt dieses Hefestammes wieder ausgeglichen werden konnte. Um einen Verlust des Plasmids zu verhindern, wurden Hefezellen mit Plasmid daher in einem synthetischen Minimalmedium (SD-Medium) kultiviert, in dem die entsprechende Aminosäure oder Nukleinsäure des Auxotrophiemarkers nicht enthalten war.

Vor der Durchführung eines Experiments wurde in der Regel eine Vorkultur angesetzt. Hierbei wurde das entsprechende Medium mit einer stecknadelkopfgroßen Menge an Hefezellen von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur auf eine optische Dichte von 0,2-0,3 OD₆₀₀ verdünnt und bis zu der gewünschten Ziel-OD₆₀₀ weiter bei 30 °C inkubiert.

2.2.3.2 Messung der optischen Dichte von Hefezellen

Für die Ermittlung der Zelldichte wurde die optische Dichte einer Hefekultur bestimmt. Hierzu wurde eine 1:5 oder 1:10-Verdünnung der Hefekultur in dem entsprechenden Medium hergestellt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ mithilfe eines Photometers gemessen.

2.2.3.3 Sporulation und Tetradendisektion

Haploide Hefestämme mit unterschiedlichem Paarungstyp wurden auf eine YPD-Kulturplatte miteinander vermischt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 3 ml PräSpo-Medium mit einer stecknadelkopfgroßen Menge dieser Mischkultur angeimpft und für 5 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. 2 ml dieser Zellsuspension wurden anschließend bei 2000 x g für 1 min abzentrifugiert und mit 2 x 1 ml ddH₂O gewaschen. Zur Sporulation der nun diploiden Hefezellen wurde das Zellpellet in 3 ml Spo-Medium

aufgenommen und 2 Tage bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Mit einem Durchlichtmikroskop wurde die Effizienz der Sporulation überprüft, bevor 2 ml der Zellsuspension bei 2000 x g für 1 min pelletiert und in 500 µl SED-Medium resuspendiert wurden. Zum Verdau der Ascuswand wurden 200 µl der Zellsuspension mit 100 mM DTT und 10 mg/ml Zymolyase vorsichtig vermischt und bei RT für 20 min inkubiert. Mit einer Impföse wurde ein Teil der Zellsuspension auf eine ebene YPD-Kulturplatte ausgestrichen und die Sporen einer Tetrade mithilfe eines Mikromanipulators separiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 2 Tage erfolgte die Analyse des Genotyps der vereinzelter Sporen durch eine Überprüfung der Auxotrophiemarker auf verschiedenen Selektionsplatten.

2.2.3.4 Transformation von Hefezellen

Für eine Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde 1 OD₆₀₀ Zellen bei einer optischen Dichte von 0,5-0,8 OD₆₀₀ in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zuerst mit 1 ml ddH₂O und danach mit 700 µl Trafo-Lösung A gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Trafo-Lösung A aufgenommen und zur Steigerung der Transformationseffizienz 2 µl denaturierte Heringssperma-DNA zugefügt. Nach der Zugabe von 1-2 µg Plasmid-DNA und 800 µl Trafo-Lösung B wurde die Zellsuspension gründlich gemischt und bei 30 °C für 20 min zur Regeneration im Thermoschüttler inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C und eine anschließende Zentrifugation bei 3000 x g für 1 min. Das Zellpellet wurde in 600 µl ddH₂O resuspendiert und 200 µl dieser Zellsuspension auf SD-Selektionsplatten ausgestrichen. Die transformierten Hefezellen wurden für 2-3 Tage bei 30 °C im Heizschrank inkubiert.

2.2.3.5 Manipulation von Gensequenzen in Hefezellen

Die Manipulation von Gensequenzen erfolgte durch eine Integration von DNA-Kassetten in die genomische DNA von *S. cerevisiae*. Die DNA-Kassetten enthalten eine Gensequenz für die Expression eines Auxotrophiemarkers, der eine Selektion der genmanipulierten Hefezellen ermöglicht. Der Auxotrophiemarker ist von DNA-Abschnitten flankiert, die homolog zu Bereichen des Zielgens sind, so dass die DNA-Kassette über eine homologe Rekombination in den entsprechenden Genlokus integriert werden kann. Die DNA-Kassetten wurden mithilfe einer PCR unter Verwendung verschiedener Plasmide als DNA-Matrize, die die Gensequenz des eingesetzten Auxotrophiemarkers codierten, hergestellt. Für die Deletion von Genen und die C-terminale Epitop-Markierung von Proteinen

wurden Konstrukte aus Longtine et al., 1998 [98] verwendet. Eine N-terminale Epitop-Markierung wurde nach Gauss et al., 2005 [99] durchgeführt.

Im Allgemeinen wurde für die Transformation von Hefezellen mit einer DNA-Kassette eine Vorkultur auf eine optische Dichte von 0,03 OD₆₀₀ verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,3-0,4 OD₆₀₀ bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 OD₆₀₀-Zellen bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert und das Transformationsprotokoll nach Abschn. 2.2.3.4 durchgeführt. Für die Transformation wurden 20 µl eines PCR-Ansatzes mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100 % (v/v) Ethanol versetzt und das PCR-Produkt durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Danach wurde das DNA-Pellet in 10 µl ddH₂O aufgenommen, mit 10 µl Heringsperma-DNA vermischt und dem Transformationsansatz zugefügt. Im Fall einer Kanamycin-Resistenz als Selektionsmarker wurden die transformierten Zellen nach dem Hitzeschock zur Regeneration für 2 h bei 30 °C in YPD-Medium inkubiert, bevor der gesamte Transformationsansatz auf eine entsprechende Selektionsplatte ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert wurde. Die erfolgreiche Integration der DNA-Kassette in das Hefegenom wurde durch ein erneutes Ausstreichen der erhaltenen Hefekolonien auf einer Selektionsplatte und eine anschließende Analyse des Genlokus auf DNA- oder Proteinebene via PCR bzw. Immunoblot festgestellt.

2.2.3.6 Cycloheximid-Abbau-Experiment

Für eine qualitative Analyse des Abbaus von Proteinen wurde ein Cycloheximid-Experiment durchgeführt. Cycloheximid wirkt als fungizides Antibiotikum, das die Proteinsynthese in Eukaryoten hemmt. Auf diese Weise kann der Abbau von Proteinen über einen bestimmten Zeitraum verfolgt werden. Zunächst wurden 40 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen bei einer optischen Dichte von 0,8 OD₆₀₀ bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 4 ml YPD-Medium resuspendiert und anschließend mit 0,4 mg/ml Cycloheximid versetzt. Zur Nullwertbestimmung wurde unmittelbar nach der Cycloheximid-Zugabe 1 ml der Zellsuspension in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 500 µl NaN₃ vorgelegt waren. Zu zwei weiteren Zeitpunkten wurde ebenfalls ein Aliquot von 1 ml entnommen. Im Anschluss wurden in Abhängigkeit des zu untersuchenden Proteins entweder ein Gesamtzellauflschluss oder eine Membranpräparation durchgeführt. Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und das Protein im Immunoblot detektiert.

2.2.3.7 *Pulse Chase-Experiment*

Um den Abbauprozess von Proteinen quantitativ zu untersuchen, wurden pro Zeitwert 5 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Zellen, die über Nacht im synthetischen Minimalmedium angezüchtet wurden, bei einer optischen Dichte von 0,8 OD₆₀₀ durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml synthetisches Minimalmedium resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Regeneration wurde die Zellsuspension bei 30 °C im Wasserbad für 5 min inkubiert. Währenddessen wurde in 50 ml-Falcon-Röhrchen 1 ml *Chase-Medium* pro Zeitwert vorgelegt. Anschließend wurde die Zellsuspension zur radioaktiven Markierung der zellulären Proteine mit 2 MBq S³⁵ *Protein Labeling-Mix* versetzt und für weitere 10 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 15000 x g für 15 s wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml *Chase-Medium* aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit dem vorgelegten *Chase-Medium* im Falcon-Röhrchen vermischt. Zur Nullwertbestimmung wurde aus dem Falcon-Röhrchen sofort wieder 1 ml der Zellsuspension entnommen und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 500 µl NaN₃ auf Eis vorgelegt waren. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden weitere Aliquots von jeweils 1 ml entnommen, mit NaN₃ vermischt und auf Eis gelagert. Nach der Abnahme des letzten Zeitwertes wurden die aliquotierten Zellsuspensionen bei 15000 x g für 1 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Es folgte ein Gesamtzellaufschluss durch mechanische Lyse nach Abschn. 2.2.2.1. Danach wurde das Zelllysate mit 1 ml IP-Verdünnungspuffer versetzt und zur Erhöhung der Lyseeffizienz für 45 min auf Eis inkubiert. Um das Zelldebris und restliche Membranbestandteile abzutrennen, wurde das Lysat bei 20000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. 900 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation des zu untersuchenden Proteins mit 15 µl Protein A-Sepharose und 1 µl Antikörper versetzt. Die Sepharose-Matrix wurde zuvor zweimal mit 1 ml IP (0,1)-Puffer gewaschen. Die Bindung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad. Am nächsten Tag wurde die Sepharose-Matrix zweimal mit 1 ml IP (0,1)-Puffer und einmal mit IP (0,02)-Puffer gewaschen. Sollte eine Abbaukinetik für CPY* erstellt werden, so folgte im Anschluss eine Deglykosylierung des Substrats mit N-Glykosidase F (NGF). Hierzu wurde die Sepharose-Matrix in 10 µl NGF-Mix aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Proben mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 65 °C für 10 min erhitzt und jeweils 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Für die Analyse der Abbaukinetik des Membranproteins 6xMyc-Hmg2 wurde Harnstoffprobenpuffer verwendet und die Proben bei 40 °C für 20 min erhitzt. Nach der SDS-PAGE wurde das SDS-Polyacrylamidgel zur Fixierung der Proteine für 10 min mit 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert und anschließend unter Vakuum

und Hitze auf einem Geltdrockner getrocknet. Die Detektion der Proteinsignale erfolgte mittels Autoradiographie. Hierzu wurde eine *Phosphorimager*-Platte über Nacht mit dem getrockneten SDS-Polyacrylamidgel exponiert und schließlich mit einem *Phosphorimager* (Typhoon FLA 9500) ausgelesen. Die Auswertung der detektierten Signale wurde mit dem *ImageQuant*-Programm durchgeführt.

2.2.3.8 Proteinase K-Sensitivitätstest zur Untersuchung des Exports von ERAD-Substraten in das Zytosol

Um den Transport einer bestimmten Substratfraktion aus dem ER in das Zytosol untersuchen zu können, wurde zunächst die Proteinsynthese durch eine Behandlung der Hefezellen mit Cycloheximid inhibiert. Hierzu wurden 40 OD₆₀₀ Zellen mit einer optischen Dichte von 0,8 OD₆₀₀ bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 7 ml YPD-Medium resuspendiert und mit 0,4 mg/ml Cycloheximid versetzt. Unmittelbar nach der Zugabe des Cycloheximids wurde 1 ml der Zellsuspension abgenommen und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µl 30 mM NaN₃ auf Eis vorgelegt waren. Die restliche Zellsuspension wurde für 1 h bei 30 °C im Wasserbad inkubiert, um den Transport von Substraten aus dem ER in das Zytosol zu ermöglichen. Anschließend wurde wiederum 1 ml der Zellsuspension entnommen und in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Pro Zeitwert wurden drei Aliquots von jeweils 1 ml entnommen und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden Mikrosomen aus den aliquotierten Zellsuspensionen präpariert. Hierzu wurde das Zellpellet nach einer Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min zweimal mit 1 ml Sorbitol-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl Sorbitol-Puffer aufgenommen und mit Glasperlen versetzt, bis noch eine dünne Flüssigkeitsschicht über den Glasperlen zu erkennen war. Die mechanische Lyse erfolgte durch heftiges Schütteln im Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min. Das Zelllysats wurde mit 600 µl Sorbitol-Puffer verdünnt, bevor durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min das Zelldebris zusammen mit den Glasperlen abgetrennt wurde. Schließlich wurden 500 µl des Zelllysats in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Proteinase K-Verdau durch Zugabe von 0,1 mg/ml Proteinase K induziert. Um die Aktivität der eingesetzten Proteinase K zu überprüfen, wurde die Membran der Mikrosomen durch eine Behandlung mit Detergenzien aufgelöst, wodurch nun auch ER luminal Proteine dem proteolytischen Verdau ausgesetzt waren. Hierzu wurden 500 µl Zelllysats mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 und 0,1 mg/ml Proteinase K versetzt. Als weitere Kontrolle wurde dem Zelllysats in einem dritten Versuchsansatz Sorbitol-Puffer anstelle von Proteinase K oder Triton X-100 zugefügt. Nach einer Inkubation der Versuchsansätze für 20 min auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM PMSF und 15 % (v/v) TCA gestoppt. Es

folgte eine Fällung der Proteine für 10 min bei 4 °C. Die ausgefallenen Proteine wurden durch eine Zentrifugation bei 21000 x g bei 4°C für 20 min pelletiert und das Präzipitat zur Entfernung von TCA-Rückständen mit 1 ml Aceton gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde schließlich in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer (pH 8) aufgenommen und bei 65 °C und 800 rpm für 10 min im Thermoschüttler erhitzt. Zur Auftrennung der Proteine wurden jeweils 10 µl der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Detektion der Proteine erfolgte in einem Immunoblot mithilfe von spezifischen Antikörpern.

2.2.3.9 Zielgerichtetes *in vivo* photocrosslinking von Der1

Für die *Crosslinking*-Experimente wurden Hefestämme verwendet, die zuvor mit zwei Plasmiden transformiert wurden. Das eine Plasmid (pGK1-pBpa) codiert eine tRNA-Synthetase, die in der Lage ist, eine spezielle tRNA, welche ebenfalls auf diesem Plasmid codiert ist, mit dem photoreaktiven Aminosäureanalogon p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBpa) zu beladen. Die pBpa-beladene tRNA baut den *Crosslinker* schließlich an der Position des Stop-Codons TAG in der Aminosäuresequenz des Zielproteins ein. Das andere Plasmid codiert ein Der1-13xMyc-Konstrukt, das für die Modifizierung mit dem *Crosslinker* an einer bestimmten Position ein TAG-Stop-Codon enthält [96].

Für die Inkorporation des *Crosslinkers* wurden 30 ml Hefe-Vorkultur mit einer optischen Dichte von 0,4-0,6 OD₆₀₀ mit 170 ml synthetischen Minimalmedium verdünnt und nach Zugabe von 400 µM pBpa über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Hefekultur 3 h vor dem Ernten der Zellen 100 µM CuSO₄ zur Induktion der Der1-Überexpression zugesetzt. Hatte die Hefekultur eine optische Dichte von 1,5 OD₆₀₀ erreicht, wurden die Zellen bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert. Hierbei wurde die 200 ml-Kultur auf 2 x 100 ml aufgeteilt, so dass ein *Crosslinking*-Ansatz aus jeweils 150 OD₆₀₀ Zellen bestand. Nach dem Waschen der Zellen mit 2 x 20 ml kaltem ddH₂O wurde das Zellpellet in 2 ml ddH₂O aufgenommen und auf eine 6-Kavitäten-Kulturplatte überführt. Es folgte die UV-Bestrahlung eines *Crosslinking*-Ansatzes auf Eis für 45 min bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm in einem Abstand von 12 cm zur UV-Lampe (100 W). Währenddessen wurde ein zweiter Ansatz als Kontrolle ohne UV-Bestrahlung auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension der *Crosslinking*-Ansätze in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen transferiert. Um Zellverluste zu vermeiden, wurden die Kavitäten mit 2 x 1 ml kaltem ddH₂O ausgespült und mit der Zellsuspension vereinigt. Die Zellen wurden bei 2000 x g für 3 min abzentrifugiert und anschließend in 800 µl IP (0,1)-Puffer resuspendiert. Zur mechanischen Lyse wurde die Zellsuspension mit Glasperlen versetzt und durch heftiges Schütteln für 4 min im Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 600 µl IP (0,1)-Puffer verdünnt, bevor das Zell-

debris durch eine Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min abgetrennt wurde. Anschließend wurde 1 ml des Überstands in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h zur Solubilisierung der Membranen auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Restliche Membranbestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C für 20 min pelletiert. Zur Präzipitation von Der1-13xMyc unter denaturierenden Bedingungen wurden 850 µl des Lysats zunächst mit 850 µl IP (0,1)-Puffer verdünnt und dann mit 20 µl Protein A-Sepharose und 1,5 µl monoklonalem α-Myc-Antikörper versetzt. Die Bindung der Proteine an die Sepharose-Matrix erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad. Weitere 50 µl des Lysats wurden als Kontrolle nach Zugabe von 50 µl 2x SDS-Probenpuffer für 10 min bei 65 °C erhitzt. Am nächsten Tag wurde die Sepharose-Matrix zweimal mit 1 ml IP (0,1)-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer durch Erhitzen bei 65 °C für 10 min von der Matrix eluiert. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 µl der 1:5 verdünnten Kontrolle und des unverdünnten Eluats auf ein 9 %iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Detektion der quervernetzten Interaktionspartner erfolgte in einem Immunoblot mittels spezifischer Antikörper.

3 Ergebnisse

3.1 Die Stabilität von Der1 in der HRD-Ligase

3.1.1 Der1 wird in Abwesenheit von Usa1 instabil und über Ubiquitinligasen des ERAD-Systems abgebaut

Das integrale Membranprotein Usa1 ist eine Untereinheit der HRD-Ligase und stellt den direkten Interaktionspartner von Der1 im Ligase-Komplex dar. Basierend auf Hydropathie-Analysen wird Usa1 als Typ III Membranprotein mit 2 Transmembrandomänen (TM-Domänen) und einem zytosolischen N- und C-Terminus beschrieben. Während der N-Terminus mit der Ubiquitinligase Hrd1 interagiert, bindet der C-Terminus an Der1 und vermittelt somit die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase [22,55,100]. Usa1 ist sowohl für den Abbau fehlgefalteter löslicher ER-Proteine, als auch für die Proteolyse membranständiger ERAD Substrate wichtig [55,101]. Das Homolog von Usa1 in Säugerzellen ist HERP, welches das humane Der1-Homolog Derlin-1 bindet und ebenfalls am Abbau fehlgefalteter ER-Proteine beteiligt ist [75,102]. Bereits in einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *USA1* die Menge an Der1 in Hefezellen deutlich reduziert [55]. Im Folgenden sollte mithilfe eines Cycloheximid-Experiments über einen Zeitraum von 90 min überprüft werden, ob Der1 in Abwesenheit von Usa1 abgebaut wird. Des Weiteren sollte der Einfluss der Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 auf die Proteolyse von Der1 getestet werden. Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese in Eukaryoten, so dass auf diese Weise der Abbau instabiler Proteine in der Zelle über einen bestimmten Zeitraum verfolgt werden kann.

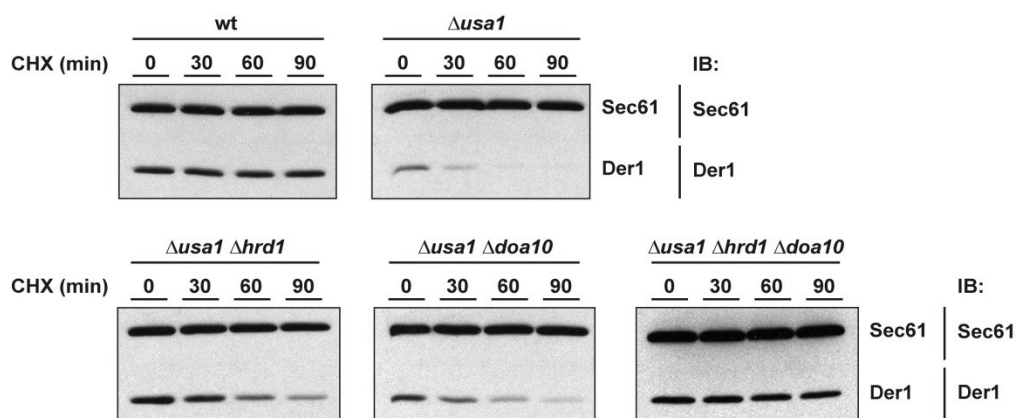


Abb. 3.1: Der1 wird über die Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 in Δusa1-Zellen abgebaut. Die Stabilität von Der1 wurde mithilfe eines Cycloheximid-Experiments ermittelt. Hierzu wurden Aliquots aus der Zellsuspension zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und anschließend Mikrosomen präpariert. Die Detektion von Der1 im Immunoblot erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper, der den C-Terminus von Der1 als Epitop erkennt. Als Ladekontrolle wurde das membranständige ER-Protein Sec61 verwendet.

Während unter Wildtyp (wt)-Bedingungen die Der1-Mengen über 90 min konstant blieben, war in $\Delta usa1$ -Zellen ein deutlicher Abbau von Der1 zu beobachten (Abb. 3.1). Die Deletion der Ubiquitinligase *HRD1* im $\Delta usa1$ -Stamm führte zu einer partiellen Stabilisierung von Der1. Dieser Effekt konnte auch für die Deletion der Ubiquitinligase *DOA10* beobachtet werden. Die Deletion beider Ubiquitinligasen im $\Delta usa1$ -Hintergrund führte zu einem additiven Effekt auf die Stabilisierung von Der1 und hatte schließlich eine komplette Inhibierung des Der1-Abbaus zur Folge. Somit scheint der Abbau von Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen über die beiden Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 zu erfolgen.

3.1.2 Der1 wird durch die Bindung an den Usa1 C-Terminus stabilisiert

Anhand von Ko-Immunopräzipitations (Ko-IP)-Experimenten mit N- bzw. C-terminal verkürzten Usa1-Mutanten konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion zu Der1 über den Usa1 C-Terminus vermittelt wird [55]. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die Expression des Usa1 C-Terminus ausreicht, um Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen zu stabilisieren.

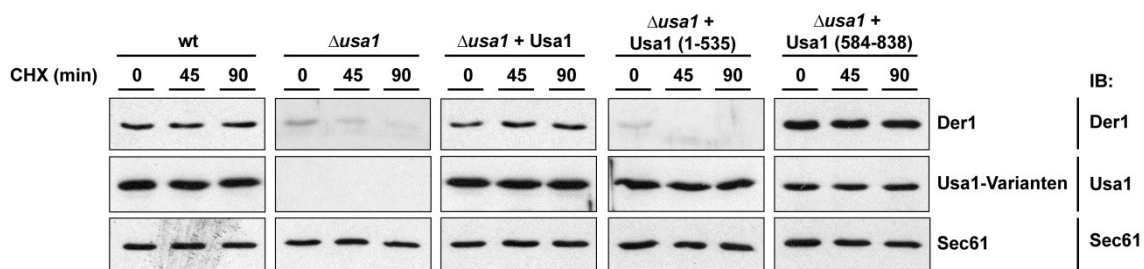


Abb. 3.2: Der Usa1 C-Terminus stabilisiert Der1. Cycloheximid-Experiment zur Ermittlung des Einflusses des Usa1 N- bzw. C-Terminus auf die Stabilität von Der1. $\Delta usa1$ -Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, die entweder den N-Terminus (1-535) oder den C-Terminus (584-838) von Usa1 codierten. Nach einer Membranpräparation erfolgte die Detektion der verschiedenen Komponenten im Immunoblot mittels spezifischer Antikörper.

Mithilfe eines Cycloheximid-Experiments konnte schließlich gezeigt werden, dass die Expression des Plasmid-codierten Usa1 C-Terminus zu einer vollständigen Stabilisierung von Der1 in der *USA1*-Deletionsmutante führt (Abb. 3.2). Die Expression des nicht-bindenden N-Terminus hatte hingegen keinen Einfluss auf den Abbau von Der1 im $\Delta usa1$ -Hintergrund. Daraus folgt, dass bereits die Bindung des Usa1 C-Terminus eine vollständige Stabilisierung von Der1 bewirkt.

3.2 Charakterisierung der Der1-Usa1-Interaktion

3.2.1 Die Modifizierung des N-Terminus reduziert die Proteinmenge von Der1

Da die Interaktion zu Usa1 sowohl für die Rekrutierung zur HRD-Ligase als auch für die Stabilität von Der1 essentiell ist, sollte der Bereich in Der1 identifiziert werden, der an Usa1 bindet. Die Wechselwirkung von Usa1 mit den direkten Interaktionspartnern Hrd1 und Der1 findet über unterschiedliche zytosolische Bereiche des Proteins statt [55,100]. Daher wurde im Vorfeld auch für Der1 angenommen, dass die Bindung zu Usa1 durch die zytosolischen Domänen vermittelt wird. Wie Usa1 ist auch Der1 ein Typ III-Membranprotein mit einem zytosolischen N- und C-Terminus [56]. Der N-terminale Bereich besteht aus 12 Aminosäuren und bildet zusammen mit der ersten TM-Domäne die ER-Signalsequenz aus [54].

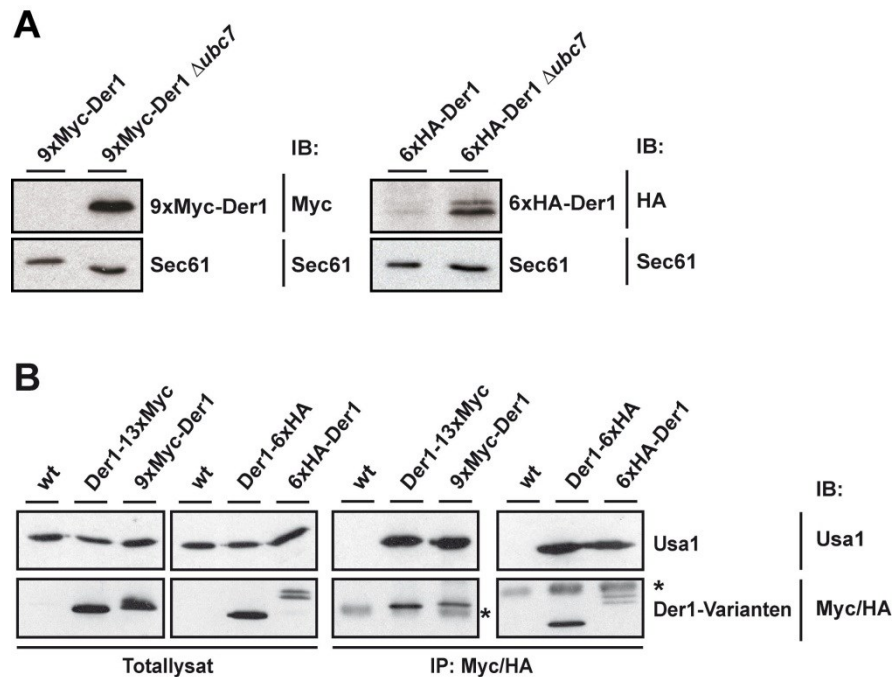


Abb. 3.3: Einfluss der Modifizierung des Der1 N-Terminus auf die Proteinmenge von Der1 und die Interaktion zu Usa1. Zum Vergleich der Proteinmenge von N-terminal modifiziertem Der1 in wt- und Δ ubc7-Zellen wurden Mikrosomen präpariert und die verschiedenen Der1-Varianten mithilfe eines monoklonalen α -Myc- bzw. α -HA-Antikörpers detektiert (A). Als Ladekontrolle diente Sec61. Der Einfluss der N-terminalen Modifizierung auf die Usa1-Interaktion wurde mit einer Ko-IP untersucht (B). Die Der1-Varianten wurden mittels monoklonalem α -HA- bzw. α -Myc-Antikörper im Δ ubc7-Hintergrund präzipitiert und Usa1 im Immunoblot detektiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

Die Modifizierung des N-Terminus mit einem 6xHA- oder 9xMyc-Epitop scheint die Proteinmengen von Der1 stark zu reduzieren, so dass kein Signal der Epitop-markierten Der1-Varianten im Immunoblot erkennbar war (Abb. 3.3 (A)). Wird jedoch der Abbau von

ER-Proteinen durch die Deletion des E2-Enzyms *UBC7* blockiert, ist ein Signal der N-terminal Epitop-markierten Der1-Varianten sichtbar. Anhand einer Ko-IP in $\Delta ubc7$ -Zellen konnte anschließend gezeigt werden, dass die Epitop-markierten Der1-Varianten weiterhin mit Usa1 interagieren (Abb. 3.3 (B)).

3.2.2 Die Deletion des Der1 C-Terminus führt zum Verlust der Usa1-Interaktion

Der Der1 C-Terminus umfasst 46 Aminosäuren und ist damit die größte zytosolische Domäne von Der1. Um die Beteiligung des C-terminalen Bereichs an der Usa1-Interaktion zu untersuchen, wurden verschiedene C-terminal verkürzte Versionen von Der1 für Bindungsstudien verwendet (Abb. 3.4 (A)). Die Der1-Varianten wurden mittels eines 13xMyc-Epitops präzipitiert und auf Interaktion mit den HRD-Ligase-Komponenten Usa1 und Hrd1 getestet.

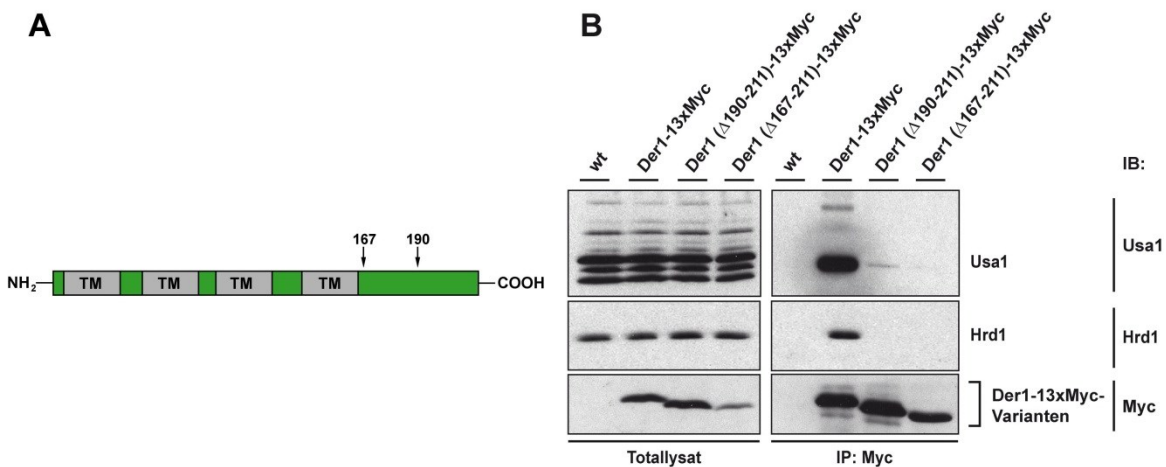


Abb. 3.4: Einfluss der C-terminalen Verkürzungen von Der1 auf die Usa1-Interaktion. Schematische Darstellung der C-terminal verkürzten Der1-Varianten (A). Die verkürzten Der1-Varianten waren mit einem C-terminalen 13xMyc-Epitop markiert und wurden in einer Ko-IP mit monoklonalen α -Myc-Antikörpern präzipitiert (B).

Sowohl die Deletion (Der1 ($\Delta 167-211$)-13xMyc) als auch eine Verkürzung (Der1 ($\Delta 190-211$)-13xMyc) des C-Terminus führte zum vollständigen Verlust der Usa1-Bindung (Abb. 3.4 (B)). Des Weiteren konnte übereinstimmend mit der Adaptorfunktion von Usa1 an der HRD-Ligase in den trunkierten Der1-Varianten auch kein Hrd1 mehr ko-präzipitiert werden.

3.2.3 Das C-terminale GHxxYY-Motiv ist an der Interaktion zu Usa1 beteiligt

Um den Bereich im Der1 C-Terminus zu identifizieren, der die Interaktion zu Usa1 vermittelt, wurde ein Sequenzvergleich des C-Terminus mit den Homologen von Der1 in Säugerzellen, den Derlins, durchgeführt (Abb. 3.5 (A)). Hierbei wurden mehrere konservierte Aminosäuren entlang des C-Terminus gefunden. Auffällig war eine Ansammlung konservierter Aminosäuren im mittleren Bereich des C-Terminus (GHxxYY). Im Folgenden wurden diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht und die Der1-Mutanten auf eine Interaktion zu Usa1 getestet (Abb. 3.5 (B)). Hierzu wurden die Plasmid-codierten Der1 Mutanten im $\Delta der1$ -Stamm exprimiert und Usa1 mittels 3xMyc-Epitop präzipitiert.

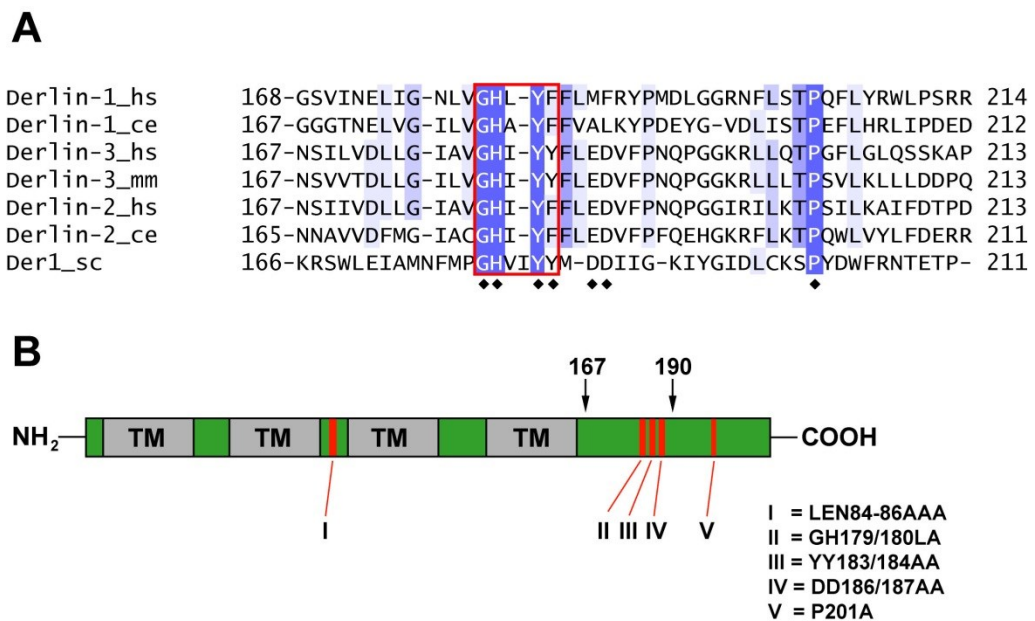


Abb. 3.5: Der C-Terminus von Der1 enthält konservierte Aminosäuren. Vergleich der Aminosäuresequenz des C-Terminus von Der1 mit Homologen aus verschiedenen Organismen (A). Derlin-1 aus *Homo sapiens* (hs, Q9BUN8 (UniProtKB accession number)), *Caenorhabditis elegans* (ce, Q93561), Derlin-2 aus *Homo sapiens* (hs, Q9GZP9), *Caenorhabditis elegans* (ce, Q21997), Derlin-3 aus *Homo sapiens* (hs, Q96Q80), *Mus Musculus* (mm, Q9D8K3), Der1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (sc, P38307). Die Ähnlichkeit der Sequenzbereiche wird durch die unterschiedliche Blaufärbung wiedergegeben. Das GHxxYY-Motiv ist rot umrandet. Schwarze Rauten = mutierte Aminosäuren. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW und Jalview erstellt. Positionen der zur Analyse der Usa1-Interaktion mutierten Aminosäuren in Der1 (B).

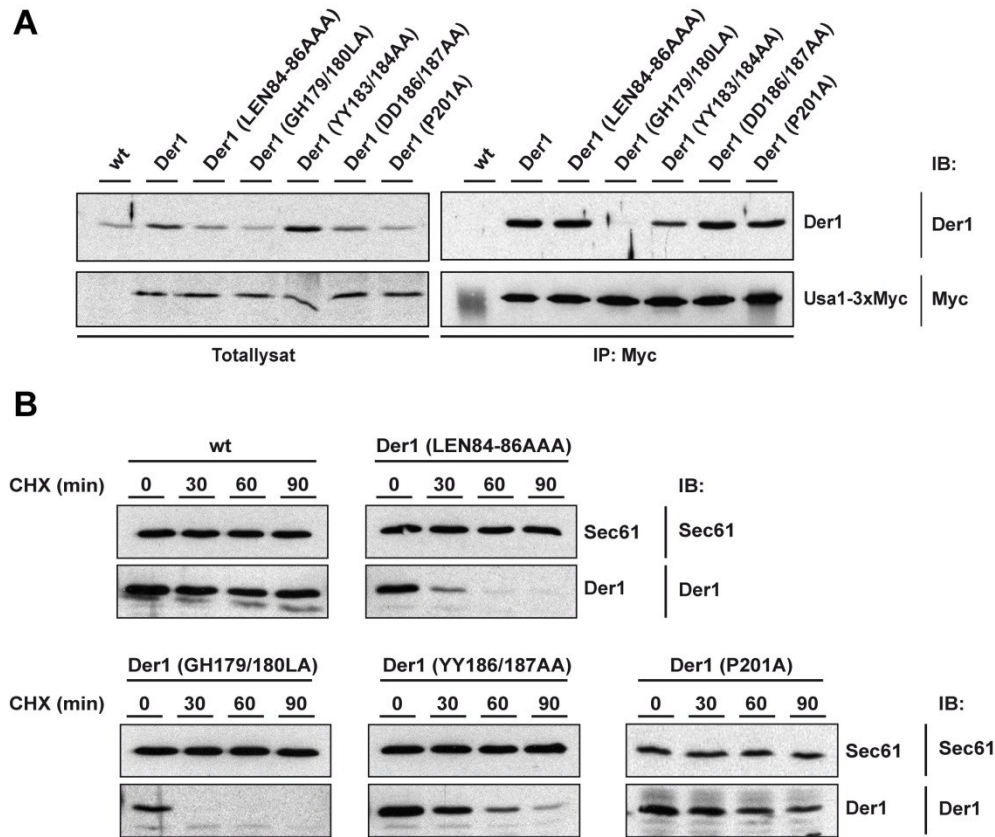


Abb. 3.6: C-terminale Punktmutationen beeinträchtigen die Usa1-Interaktion und die Stabilität von Der1. Ko-IP zur Analyse der Interaktion von Der1-Punktmutanten mit Usa1 (A). Da ein Verlust der Usa1-Interaktion zum Abbau von Der1 führt, wurde das Experiment in einer *UBC7*-Deletionsmutante durchgeführt. Für die Ko-IP wurden $\Delta der1 \Delta ubc7$ Usa1-3xMyc-Zellen mit Plasmid-codierten Der1-Punktmutanten transformiert und anschließend Usa1-3xMyc mittels monoklonalem α -Myc-Antikörper präzipitiert. Cycloheximid-Experiment zur Ermittlung der Stabilität verschiedener Der1-Punktmutanten (B). Die Plasmid-codierten Der1-Punktmutanten wurden in $\Delta der1$ -Zellen exprimiert und Der1 mit einem spezifischen Antikörper im Immunoblot detektiert.

Die Expression der Der1 (GH179/180LA)-Mutante führte zum Verlust der Usa1-Interaktion. Ebenso war für die Der1 (YY183/184AA)-Mutante eine deutlich reduzierte Wechselwirkung mit Usa1 erkennbar. Dagegen hatten weitere Mutationen sowohl im C-terminalen (Der1 (DD186/187AA), Der1 (P201A)) als auch im zytosolischen Bereich (Der1 (LEN84-86AAA)) keinen Einfluss auf die Usa1-Bindung (Abb. 3.6 (A)). Da Der1 durch die Interaktion mit Usa1 stabilisiert wird (Abschn. 3.1.2), wurde die Stabilität der verschiedenen Der1-Mutanten anschließend im Cycloheximid-Experiment getestet (Abb. 3.6 (B)). Die Expression der Plasmid-codierten Der1-Varianten im $\Delta der1$ -Hintergrund zeigte, dass die Usa1-Interaktionsmutanten (Der1 (GH179/180LA) und Der1 (YY183/184AA)) über einen Zeitraum von 90 min abgebaut werden. Hierbei korrelierte die Stabilität der Mutanten mit der Fähigkeit Usa1 zu binden. So zeigte die Der1 (YY183/184AA)-Mutante, die noch schwach mit Usa1 interagierte, eine geringere Instabilität auf als Der1 (GH179/180LA). Obwohl der Aminosäureaustausch in der zytosolischen Schleife (Der1 (LEN84-86AAA)) keinen Einfluss auf die Usa1-Interaktion

hatte, war die Mutante ebenfalls instabil. Dies ist wahrscheinlich auf strukturelle Defekte und eine Fehlfaltung des Proteins durch die Mutation zurückzuführen. Letztendlich ist festzuhalten, dass das konservierte C-terminale GHxxYY-Motiv für die Wechselwirkung mit Usa1 notwendig ist und somit als ein Usa1-Interaktionsmotiv identifiziert wurde.

3.2.4 Die Fusion des Der1 C-Terminus an das Der1-Homolog Dfm1 ermöglicht eine direkte Interaktion des Fusionsproteins mit Usa1

Die Funktion des Der1 C-Terminus als Usa1-Bindungsdomäne sollte durch eine Fusion dieses Bereichs mit dem Der1-Homolog in *S. cerevisiae*, Dfm1 (Der1-like Family Member 1), bestätigt werden. Dfm1 weist eine Sequenzübereinstimmung von 22 % mit Der1 auf und besitzt zudem eine ähnliche Topologie. Es besteht aus 4 TM-Domänen, die von einem zytosolischen N- bzw. C-Terminus flankiert sind [54]. Vor kurzem wurde Dfm1 als weitere Komponente der HRD-Ligase identifiziert, wobei dessen Bedeutung beim Abbau fehlgefalteter ER-Proteine noch unklar ist [61]. Des Weiteren ist bekannt, dass Dfm1 kein direkter Interaktionspartner von Usa1 ist, sondern über Hrd1 an Usa1 bindet (nicht gezeigte Daten). Um zu zeigen, dass der Der1 C-Terminus aktiv die Bindung zu Usa1 vermittelt, wurde der C-Terminus von Dfm1 durch den Der1 C-Terminus ersetzt, indem dieser an die 4. TM-Domäne von Dfm1 fusioniert wurde (Abb. 3.7 (A)). Die Fähigkeit des Fusionsproteins mit Usa1 zu interagieren, wurde durch eine Ko-IP von Usa1-3xMyc getestet. Um auszuschließen, dass das Fusionsprotein indirekt über Hrd1 an Usa1 bindet und mit wt-Der1 um die Usa1-Wechselwirkung kompetiert, wurde das Experiment in einer $\Delta der1 \Delta hrd1$ -Doppelmutante durchgeführt.

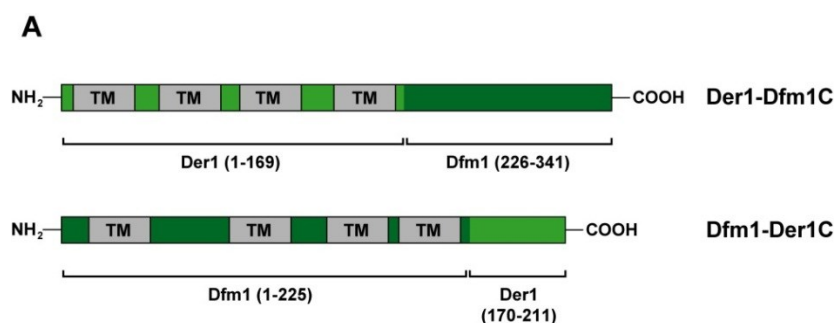


Abb. 3.7 (A): Die Funktion des Der1 C-Terminus als Usa1-Bindungsdomäne ist auf andere Proteine übertragbar. Schematische Darstellung der Der1-Dfm1-Hybride.

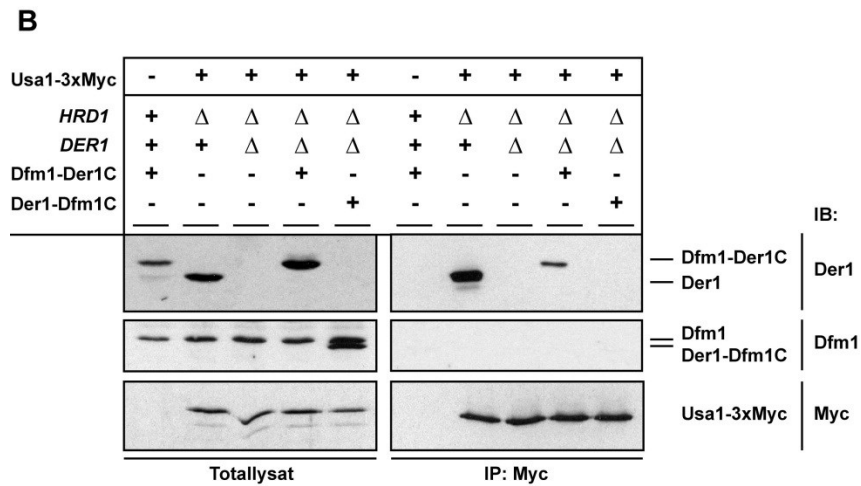


Abb. 3.7 (B): Die Funktion des Der1 C-Terminus als Usa1-Bindungsdomäne ist auf andere Proteine übertragbar. Die Fähigkeit der Der1-Dfm1-Fusionsproteine, mit Usa1 zu interagieren, wurde mit einer Ko-IP untersucht. Hierzu wurde Usa1-3xMyc in Usa1-3xMyc Δ *der1* Δ *hrd1*-Zellen präzipitiert und die Plasmid-codierten Fusionsproteine im Immunoblot mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen Der1 und Dfm1 detektiert.

Die Fusion des Der1 C-Terminus ermöglichte Dfm1, unabhängig von Hrd1 mit Usa1-3xMyc zu interagieren, wobei die Interaktion deutlich schwächer war als die Bindung von wt-Der1 an Usa1-3xMyc (Abb. 3.7 (B)). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Struktur des C-Terminus durch die Fusion mit Dfm1 beeinflusst und damit die Bindung zu Usa1 abgeschwächt wird. Dagegen war das Der1-Dfm1-Hybrid, das den Dfm1 C-Terminus exprimiert, nicht in der Lage, mit Usa1-3xMyc zu interagieren. Da beide Fusionsproteine instabil sind, war eine funktionelle Analyse in Bezug auf den Abbau von ERAD-Substraten nicht möglich (nicht gezeigte Daten). Dennoch bestätigen die Bindungsstudien der Der1-Dfm1-Fusionsproteine die Funktion des Der1 C-Terminus als Usa1-Interaktionsdomäne.

3.3 Charakterisierung der Der1-Oligomerisierung

3.3.1 Der1 bildet Oligomere

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass einige Komponenten der HRD-Ligase wie Hrd1, Hrd3 und Usa1 Homooligomere ausbilden. Des Weiteren wurde mithilfe von Gelfiltrationsexperimenten eine dimere Struktur der HRD-Ligase postuliert [55,73,103]. Um die Oligomerisierung von Der1 zu untersuchen, wurden Hefestämme, die endogen Epitop-markiertes Der1 (Der1-13xMyc) exprimierten, mit Plasmid-codiertem wt-Der1 transformiert. Auf diese Weise exprimierten die Hefezellen nun zwei unterschiedliche Der1-Konstrukte. Der1-13xMyc wurde mit monoklonalen α -Myc-Antikörpern unter nativen Bedingungen gefällt und das interagierende wt-Der1 mit einem α -Der1-Antikörper im

Immunoblot detektiert. Um eine unspezifische Interaktion der beiden Der1-Varianten nach dem Zellaufschluss auszuschließen, wurde das Solubilisat von zwei Stämmen, die entweder Der1-13xMyc oder wt-Der1 exprimierten, gemischt und anschließend eine Ko-IP mit Der1-13xMyc durchgeführt.

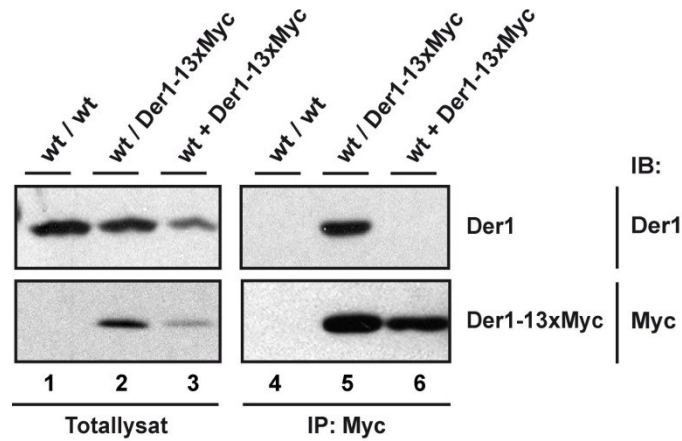


Abb. 3.8: Der1-13xMyc interagiert mit wt-Der1. Membranproteine aus dem Totallysat von Hefezellen, die entweder wt-Der1 (Spur 1 und 4) oder wt-Der1 und Der1-13xMyc (Spur 2 und 5) ko-exprimierten, wurden mit Digitonin-Puffer solubilisiert und Der1-13xMyc unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit einem monoklonalen α -Myc-Antikörper präzipitiert. Als Kontrolle für eine spezifische Interaktion zwischen den beiden Der1-Varianten wurde mit einem Lysatgemisch aus Hefezellen, die entweder wt-Der1 oder Der1-13xMyc exprimierten (Spur 3 und 6), ebenfalls eine Ko-IP mit α -Myc-Antikörpern durchgeführt.

Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, konnte wt-Der1 im Präzipitat der Ko-IP detektiert und damit in Übereinstimmung mit der Literatur eine Oligomerisierung von Der1 gezeigt werden [59]. Im Gegensatz dazu wurde im Gemisch der Lysate aus Zellen, die entweder die Epitop-markierte Variante oder wt-Der1 exprimierten, keine Interaktion nachgewiesen. Daher kann eine unspezifische Wechselwirkung zwischen den Der1-Varianten ausgeschlossen werden.

Da für die Oligomerisierung der HRD-Ligase eine dimere Struktur postuliert wird, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Der1 als Dimer oder Multimer vorliegt. Es wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt, um den Einfluss von Der1 auf die Größe der HRD-Ligase festzustellen und daraus das ungefähre Molekulargewicht des Der1-Oligomers zu bestimmen. Aufgrund des geringen Molekulargewichts von Der1 ist zu erwarten, dass der Effekt einer *DER1*-Deletion auf das Migrationsverhalten der HRD-Ligase nur sehr schwach sein wird. Daher wurde das Experiment im $\Delta hrd1$ -Stammhintergrund durchgeführt und somit nur das Laufverhalten von Usa1 in Abhängigkeit von Der1 mit einer Gelfiltration analysiert.

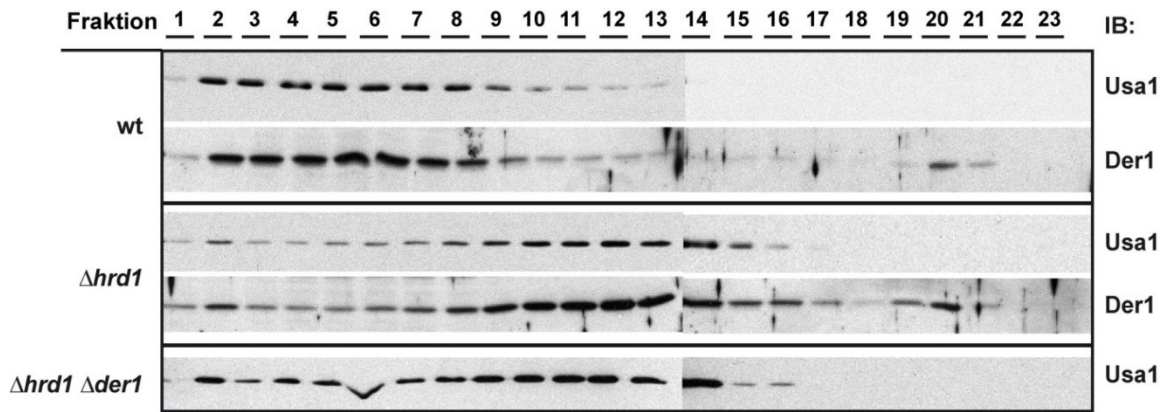


Abb. 3.9: Die Deletion von *DER1* hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von *Usa1* in der Gelfiltration. Zur Analyse der Größe des Der1-Oligomers wurden Mikrosomen aus wt-, $\Delta hrd1$ - bzw. $\Delta hrd1 \Delta der1$ -Zellen präpariert und mit Digitonin-Puffer solubilisiert. Anschließend wurde eine Gelfiltration mit dem Solubilisat durchgeführt und die Proteine in den gesammelten Fraktionen mit TCA gefällt. Die Detektion von Der1 und Usa1 erfolgte durch einen Immunoblot und spezifischen Antikörpern gegen beide Proteine.

Die Deletion von *HRD1* verursachte eine deutliche Verschiebung des Laufverhaltens von Der1 und Usa1, was auf eine Größenreduzierung des Usa1-Der1-Komplexes schließen lässt. Dagegen konnte in der $\Delta hrd1 \Delta der1$ -Doppelmutante im Vergleich zum $\Delta hrd1$ -Stamm kein weiterer Unterschied im Migrationsverhalten von Usa1 beobachtet werden (Abb. 3.9). Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass Der1 nur schwach mit Usa1 interagiert und daher ein Teil der Der1-Fraktion während der Probenpräparation von Usa1 dissoziierte. Darauf deutet das Auftreten einer zweiten Der1-Fraktion im niedermolekularen Bereich der Gelfiltration hin. Ebenso ist es möglich, dass die Der1-Der1-Interaktion recht instabil ist und dadurch kein Einfluss der *DER1*-Deletionsmutante auf das Migrationsverhalten von Usa1 erkennbar war. Letztendlich ist festzuhalten, dass mittels Gelfiltration die Größe des Der1-Oligomers nicht bestimmt werden konnte.

3.3.2 Usa1 vermittelt die Der1-Oligomerisierung

Zur weiteren Charakterisierung des Der1-Oligomers sollte untersucht werden, welche Komponenten der HRD-Ligase an der Oligomerisierung von Der1 beteiligt sind. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Usa1 die Oligomerisierung der Ubiquitinligase Hrd1 vermittelt und somit als ein Gerüstprotein des Ligase-Komplexes fungiert [55]. Im Folgenden wurde mittels Ko-IP die Der1-Oligomerisierung in Abhängigkeit verschiedener Komponenten der HRD-Ligase untersucht.

In $\Delta usa1$ -Zellen war die Oligomerisierung von Der1 stark gestört, während die Deletion anderer ERAD-Faktoren keinen Einfluss auf die Oligomerbildung hatte (Abb. 3.10).

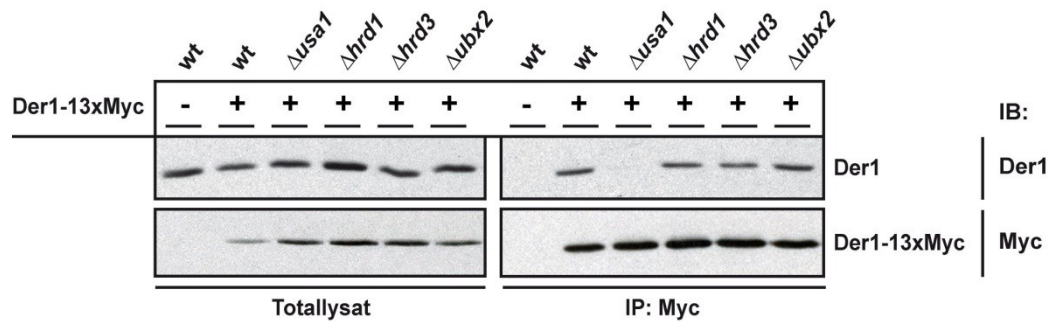


Abb. 3.10: Einfluss der verschiedenen HRD-Ligase-Komponenten auf die Der1-Oligomerisierung. Endogenes Der1-13xMyc und Plasmid-codiertes wt-Der1 wurden in verschiedenen Deletionsstämmen ko-exprimiert und die Oligomerbildung mittels Ko-IP untersucht.

Der Effekt von *Usa1* auf die Der1-Oligomerisierung kann jedoch nicht auf eine Destabilisierung von Der1 im $\Delta usa1$ -Stamm zurückgeführt werden. Durch ein Cycloheximid-Experiment wurde gezeigt, dass bei einer Ko-Expression von Der1-13xMyc und wt-Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen beide Der1-Varianten stabil sind (Abb. 3.11 (A)). Um festzustellen, ob Der1-13xMyc den Abbau von Membranproteinen blockiert und auf diese Weise beide Der1-Varianten stabilisiert werden, wurde die Proteolyse des membranständigen ERAD-Substrats 6xMyc-Hmg2 analysiert. Wie in Abb. 3.11 (B) deutlich wird, scheint die Fusion des 13xMyc-Epitops die Funktionalität von Der1 zu beeinträchtigen, wodurch sich der Abbau des luminalen ERAD-Substrats CPY* signifikant verzögerte (CPY* ist eine fehlgefaltete Variante des vakuolären Proteins Carboxypeptidase Y). Dagegen wurde die Proteolyse von 6xMyc-Hmg2 nicht wesentlich durch Der1-13xMyc beeinflusst. Damit kann die Stabilisierung der Der1-Varianten nicht mit einer Inhibierung des Abbaus von Membranproteinen erklärt werden.

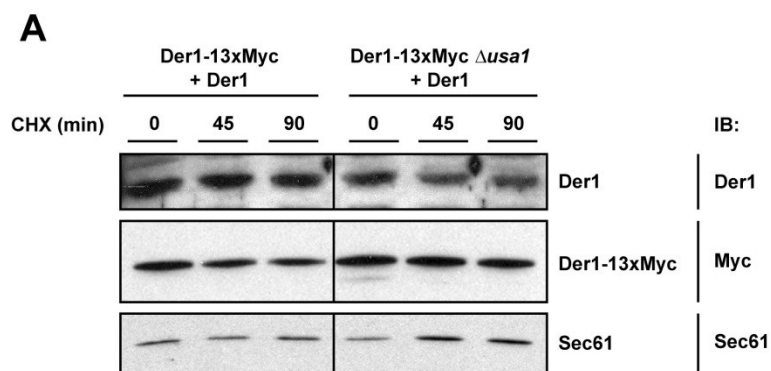


Abb. 3.11 (A): Stabilität und Funktionalität von Der1-13xMyc. Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Stabilität von Der1-13xMyc und ko-exprimiertem wt-Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen.

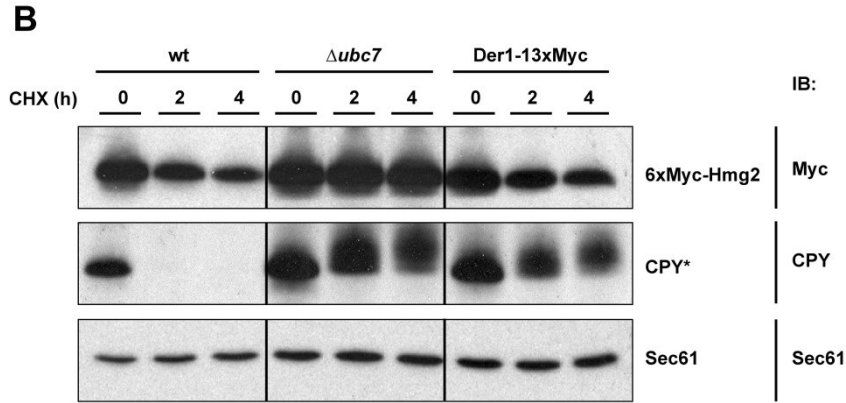


Abb. 3.11 (B): Stabilität und Funktionalität von Der1-13xMyc. Cycloheximid-Experiment zur Analyse des Einflusses von Der1-13xMyc auf den Abbau membranständiger und luminaler ERAD-Substrate. 6xMyc-Hmg2 wurde als Modellsubstrat für Membranproteine verwendet, die über die HRD-Ligase abgebaut werden. CPY* hingegen diente als Modellsubstrat für fehlgefaltete luminal ER-Proteine. Als Kontrolle für eine Blockierung des Abbaus beider Modellsubstrate wurde das Experiment in einer $\Delta ubc7$ -Mutante durchgeführt.

Um die Bedeutung von Usa1 für die Oligomerbildung zu bestätigen, wurden die Experimente der Der1-Oligomerisierung mit einer 1xHA-markierten Der1-Variante (Der1-1xHA) anstelle von Der1-13xMyc wiederholt.

Anhand des Abbaus von CPY* konnte gezeigt werden, dass die Fusion des 1xHA Epitops die Funktionalität von Der1 nicht beeinflusst (Abb. 3.12 (A)). Des Weiteren wurde Der1-1xHA wie unmarkiertes Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen instabil und abgebaut. Eine Ko-IP machte deutlich, dass auch Der1-1xHA in der Lage ist, mit wt-Der1 in Abhängigkeit von Usa1 zu interagieren und Oligomere auszubilden (Abb. 3.12 (B)). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Usa1 als strukturelle Komponente nicht nur die Oligomerisierung von Hrd1 sondern auch die Bildung des Der1-Oligomers vermittelt.

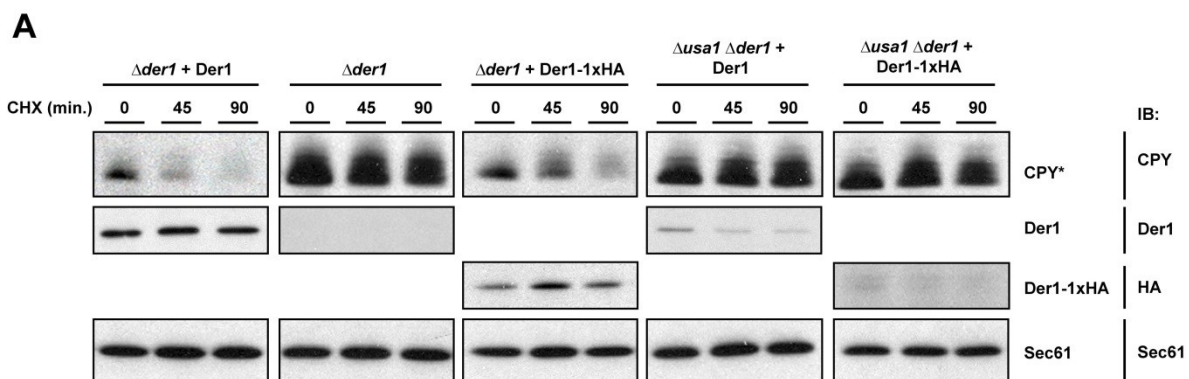


Abb. 3.12 (A): Der1-1xHA ist funktionell und bildet in Abhängigkeit von Usa1 Oligomere aus. Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Stabilität und Funktionalität von Der1-1xHA. $\Delta der1$ - und $\Delta usa1 \Delta der1$ -Zellen wurden mit Plasmid-codiertem wt-Der1 oder Der1-1xHA transformiert und anschließend die Stabilität der Der1-Varianten untersucht. Die Funktionalität von Der1-1xHA wurde anhand der Proteolyse von CPY* ermittelt.

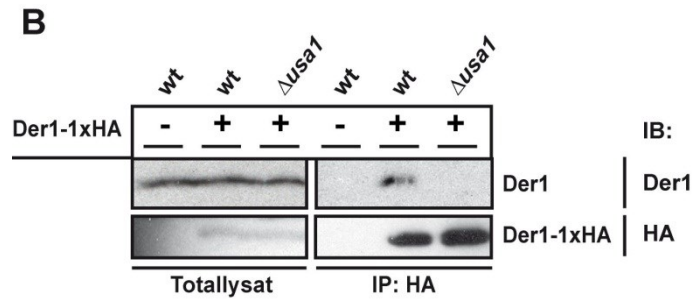


Abb. 3.12 (B): Der1-1xHA ist funktionell und bildet in Abhängigkeit von Usa1 Oligomere aus. Ko-IP zur Analyse der Oligomerbildung von Der1-1xHA. Plasmid-codiertes Der1-1xHA wurde mit endogenem wt-Der1 im wt-Stamm sowie in $\Delta usa1$ -Zellen ko-exprimiert. Nach Solubilisierung der Membranproteine in Digitonin-Puffer wurde Der1-1xHA mittels monoklonaler α -HA-Antikörper präzipitiert und die beiden Der1-Varianten im Immunoblot detektiert.

3.3.3 Der1-Varianten mit verkürztem C-Terminus oder Mutationen im C-terminalen Usa1-Interaktionsmotiv können keine Oligomere bilden

Die in Abschn. 3.3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Usa1 eine entscheidende Rolle bei der Der1-Oligomerisierung spielt. Um die Bedeutung von Usa1 für die Bildung des Der1-Oligomers zu belegen, wurde die Oligomerisierung von Der1-Mutanten getestet, die nicht mehr mit Usa1 interagieren können. Zum einen wurde C-terminal verkürztes Der1-13xMyc (Der1 ($\Delta 190$ -211)-13xMyc und Der1 ($\Delta 167$ -211)-13xMyc) mit wt-Der1 ko-exprimiert. Zum anderen wurden Hefestämme, die endogen Volllänge-Der1-13xMyc exprimieren, mit Der1-Punktmutanten transformiert, die Mutationen im Usa1-Interaktionsmotiv (GHxxYY) enthalten.

Die C-terminal trunkierten Der1-Varianten waren nicht in der Lage, Oligomere auszubilden (Abb. 3.13 (A)). Auch die Mutation des GHxxYY-Motivs verhinderte eine Oligomerisierung (Abb. 3.13 (B)). Somit korrelierte die Der1-Oligomerisierung mit der Fähigkeit, Usa1 zu binden, was die Funktion von Usa1 bei der Oligomerbildung verdeutlicht.

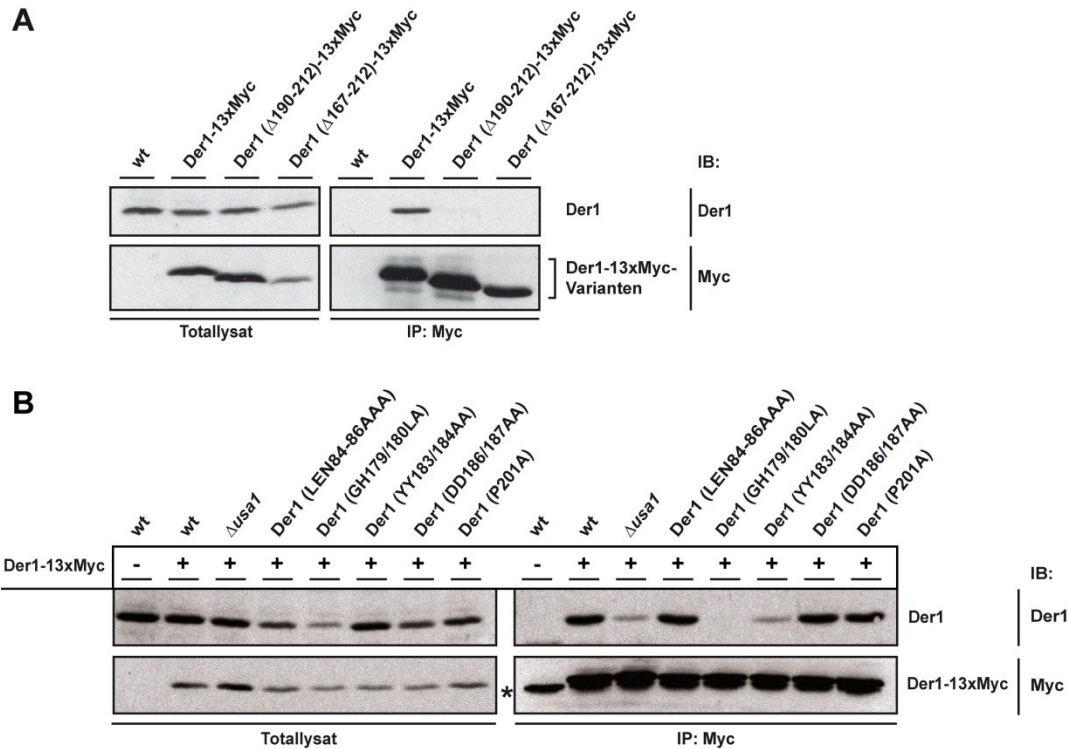


Abb. 3.13: Die Bindung von Usa1 ist für die Der1-Oligomerisierung notwendig. Ko-IP zur Untersuchung der Oligomerbildung C-terminal verkürzter Der1-Varianten (A). Hefestämme, die endogen C-terminal verkürztes Der1-13xMyc exprimieren, wurden mit Plasmid-codiertem wt-Der1 transformiert und anschließend einer Ko-IP unterzogen. Ko-IP zur Analyse der Oligomerbildung von Der1-Punktmutanten (B). Endogenes Der1-13xMyc wurde mit Plasmid-codierten Der1-Punktmutanten ko-exprimiert und die Epitop-markierte Der1-Variante mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper präzipitiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

3.3.4 Usa1 oligomerisiert unabhängig von Der1 und Hrd1

Berichte aus der Literatur zeigen, dass auch Usa1 Oligomere bildet und dadurch die Oligomerisierung von Hrd1 induziert [55,73]. Zur weiteren Charakterisierung der Gerüstfunktion von Usa1 in der HRD-Ligase sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Usa1-Oligomerisierung von anderen Komponenten der HRD-Ligase beeinflusst wird und welche Domäne von Usa1 bei der Oligomerisierung beteiligt ist. Zur Charakterisierung des Usa1-Oligomers wurden Hefestämme, die endogen Usa1-3xMyc exprimieren, mit Plasmid-codiertem wt-Usa1 bzw. trunkierten Usa1-Varianten transformiert.

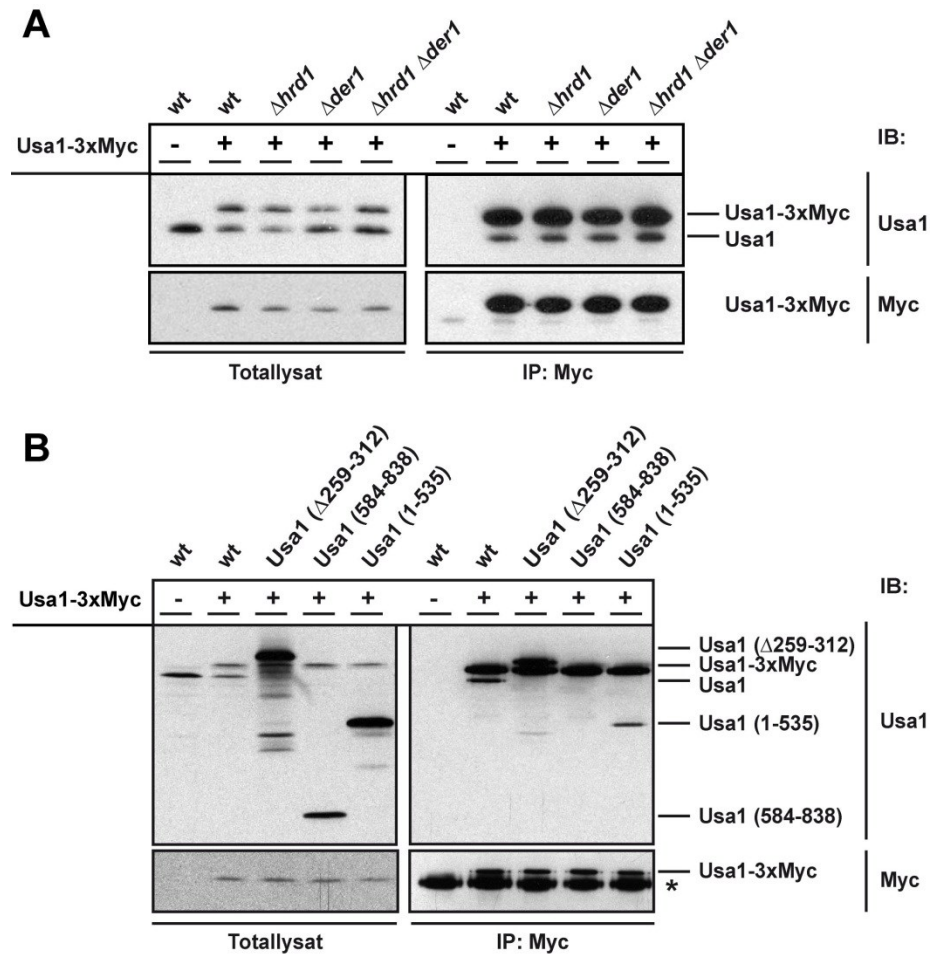


Abb. 3.14: Der N-Terminus vermittelt die Selbstoligomerisierung von Usa1. Ko-IP zur Analyse der Usa1-Oligomerisierung in Abhängigkeit von Hrd1 und Der1 (A). Endogenes Usa1-3xMyc wurde mit Plasmid-codiertem wt-Usa1 ko-exprimiert. Nach Solubilisierung der Membranproteine in Digitonin-Puffer wurde Usa1-3xMyc mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper präzipitiert und beide Usa1-Varianten im Immunoblot durch spezifische Antikörper detektiert. Ko-IP zur Charakterisierung der Usa1-Selbstoligomerisierung (B). Hefestämme, die endogen Usa1-3xMyc exprimieren, wurden mit unterschiedlichen Plasmid-codierten Usa1-Fragmenten transformiert. Die Präzipitation und Detektion der Usa1-Varianten erfolgte wie in (A). * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

Wie aus Abb. 3.14 (A) ersichtlich wird, hatte die Deletion der beiden direkten Interaktionspartner *DER1* und *HRD1* keinen Einfluss auf die Usa1-Oligomerisierung. Demnach besitzt Usa1 die Fähigkeit, eigenständig Oligomere zu bilden. Zudem machte die Ko-Expression trunkierter Usa1-Varianten mit Usa1-3xMyc deutlich, dass die Selbstoligomerisierung über den N-Terminus (Usa1 (1-535)) von Usa1 erfolgt (Abb. 3.14 (B)). Die Deletion der N-terminalen UBL-Domäne (Usa1 ($\Delta 259-312$)) hatte hierbei keinen Einfluss auf die Ausbildung des Usa1-Oligomers (siehe auch Abschn. 3.3.5). Während der N-Terminus mit Usa1-3xMyc ko-präzipitiert wurde, konnte eine Interaktion des C-Terminus (Usa1(584-838)) mit Usa1-3xMyc nicht nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung dieses Bereichs bei der Usa1-Selbstoligomerisierung unwahrscheinlich ist.

3.3.5 Die Usa1-Selbstoligomerisierung induziert die Oligomerbildung von Hrd1 und Der1

Da der N-Terminus die Selbstoligomerisierung von Usa1 vermittelt, sollte mithilfe von N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten der Bereich identifiziert werden, der für die Oligomerbildung von Usa1 und damit auch der HRD-Ligase verantwortlich ist. Der N-Terminus stellt mit 535 Aminosäuren den größten löslichen Bereich von Usa1 im Zytosol dar und enthält eine UBL (*ubiquitin-like*)-Domäne (259-312), dessen Funktion noch weitgehend unbekannt ist [101]. Zwischen der UBL-Domäne und der ersten TM-Domäne befindet sich ein Bereich (437-490), der für die Interaktion mit Hrd1 verantwortlich ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Deletion eines Bereichs (319-418) unmittelbar nach der UBL-Domäne die Oligomerisierung von Usa1 und Hrd1 stört, während der Bereich 319-371 keinen Einfluss auf die Oligomerisierung hat. Daher wurde postuliert, dass der Bereich 371-418 die Oligomerisierung von Usa1 und Hrd1 vermittelt [73]. Um die Vermutung zu bestätigen, wurde dieser Bereich in Usa1 gegen ein 6xHA-Epitop ersetzt und neben der Oligomerisierung von Usa1 und Hrd1 auch die Oligomerbildung von Der1 getestet (Abb. 3.15).





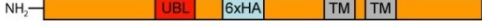
		Oligomerisierung			Interaktion	
		Usa1	Der1	Hrd1	Der1	Hrd1
Usa1	NH ₂  COOH	+	+	+	+	+
Usa1 (Δ259-312)-6xHA	NH ₂  COOH	+	+	+	+	+
Usa1 (Δ1-535)-6xHA	NH ₂  COOH	-	-	-	+	-
Usa1 (Δ319-418)-6xHA	NH ₂  COOH	-	-	-	+	+
Usa1 (Δ372-418)-6xHA	NH ₂  COOH	-	-	-	+	+

Abb. 3.15: Schematische Darstellung der N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten sowie deren Einfluss auf die Oligomerisierung und Interaktion der HRD-Ligase-Komponenten. Die Deletion des Bereiches 372-418 in Usa1 verhindert die Oligomerisierung der HRD-Ligase, ermöglicht aber weiterhin eine Interaktion der Usa1-Mutante mit Der1 und Hrd1.

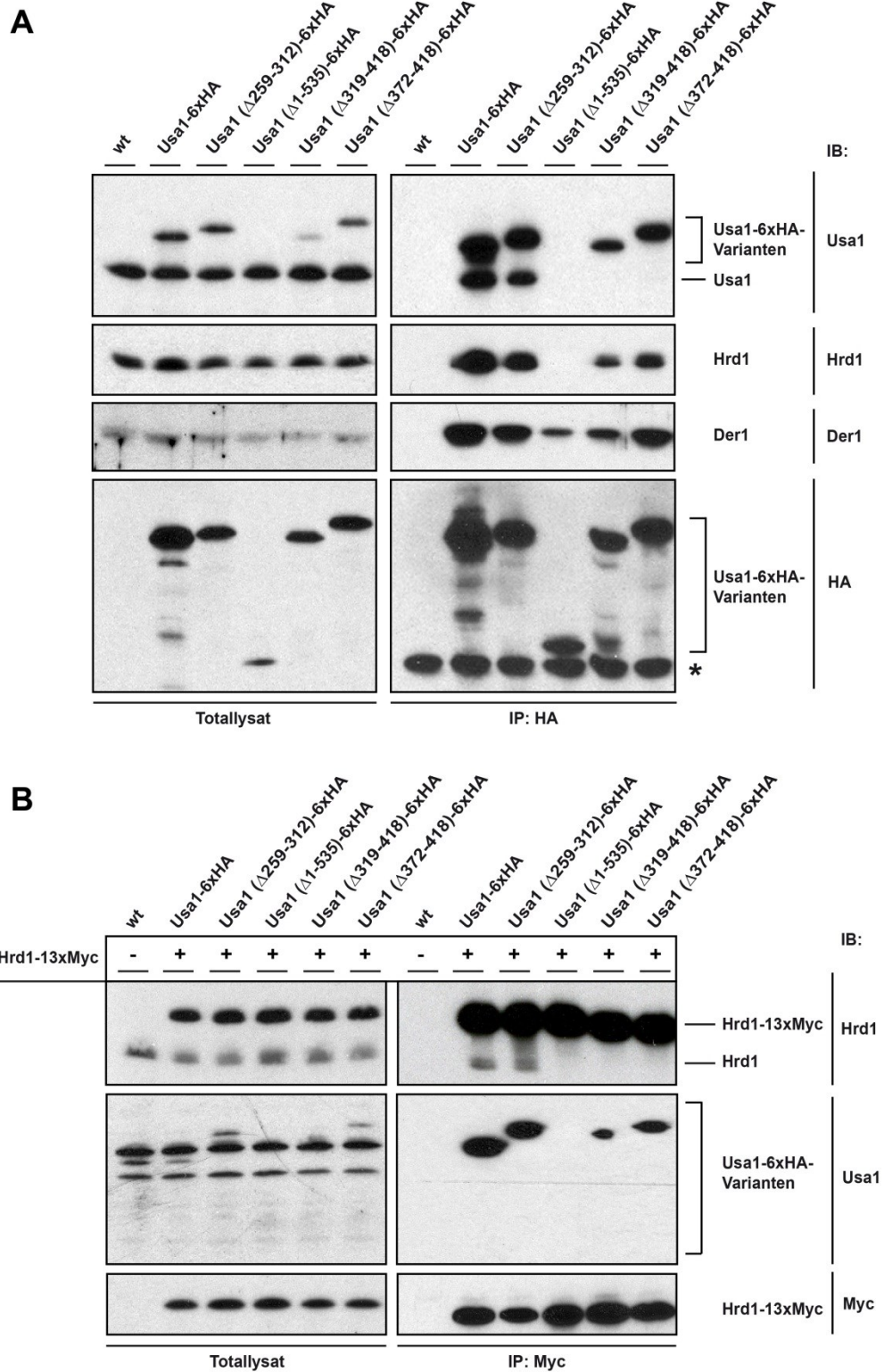


Abb. 3.16 (A und B): Einfluss der N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten auf die Oligomerisierung der HRD-Ligase. Ko-IP zum Einfluss der Usa1-Deletionsmutanten auf die Ausbildung des Usa1-Oligomers (A). Hefestämme, die endogen 6xHA-markierte Usa1-Deletionsmutanten exprimieren, wurden mit Plasmid-codiertem wt-Usa1 transformiert und anschließend mittels monoklonaler α -HA-Antikörper präzipitiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper. Ko-IP zum Einfluss der Usa1-Deletionsmutanten auf die Hrd1-Oligomerisierung (B). Plasmid-codiertes Hrd1-13xMyc wurde mit endogenem wt-Hrd1 in den verschiedenen Usa1-Deletionsmutanten ko-exprimiert und nach einer Solubilisierung der Membranproteine in Digitonin-Puffer durch monoklonale α -Myc-Antikörper präzipitiert.

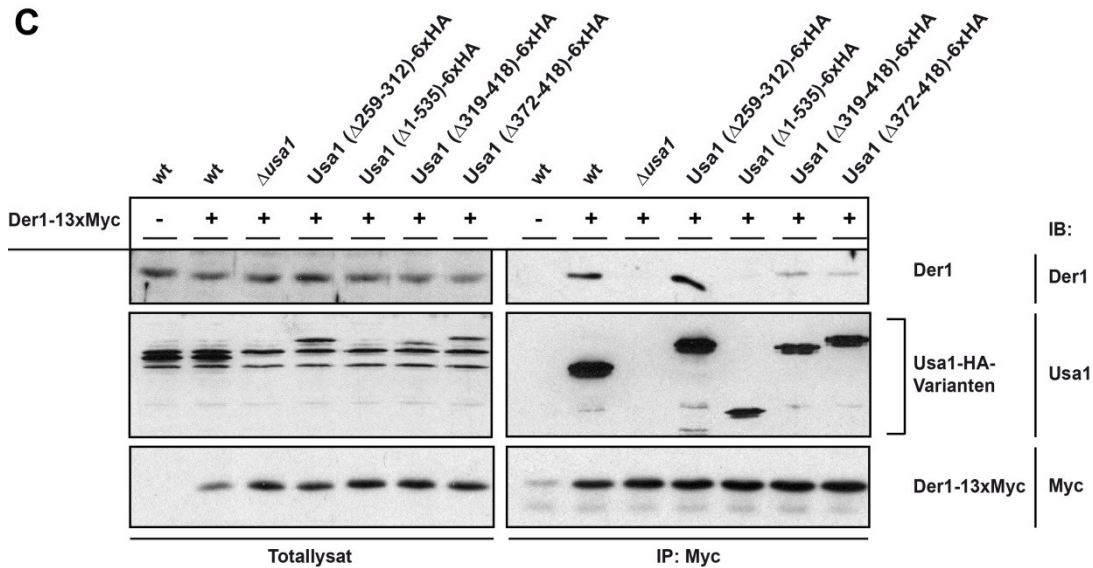


Abb. 3.16 (C): Einfluss der N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten auf die Oligomerisierung der HRD-Ligase. Ko-IP zum Einfluss der Usa1-Deletionsmutanten auf die Der1-Oligomerisierung. Endogenes Der1-13xMyc wurde mit Plasmid-codiertem wt-Der1 ko-exprimiert und wie in den Experimenten zuvor mittels spezifischer Antikörper präzipitiert.

Die Deletion des gesamten N-Terminus verhinderte die Interaktion mit Hrd1 und dadurch dessen Oligomerisierung (Abb. 3.16 (A, B)). Ebenso war die Oligomerbildung von Usa1 und Der1 in dieser Usa1-Mutante gestört (Abb. 3.16 (A, C)). Dagegen hatte der Austausch der UBL-Domäne gegen ein 6xHA-Epitop keinen Einfluss auf die Interaktion oder Oligomerisierung der HRD-Ligase-Komponenten. Auch die Usa1 (Δ372-418)-6xHA-Mutante interagiert weiterhin mit Der1 und Hrd1, so dass die Zusammensetzung der HRD-Ligase nicht gestört war (Abb. 3.16 (A)). Allerdings verhinderte die Deletion dieses N-terminalen Bereiches sowohl die Usa1-Selbstoligomerisierung als auch die Oligomerbildung von Der1 und Hrd1 (Abb. 3.16 (A, B, C)). Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass Usa1 über einen Bereich (372-418) im N-Terminus selber Oligomere ausbildet und dadurch die Oligomerisierung der beiden direkten Interaktionspartner Der1 und Hrd1 induziert.

3.3.6 Die Hochregulierung des Der1-Expressionslevels durch UPR-Induktion ermöglicht eine Usa1-unabhängige Selbstoligomerisierung von Der1

In der Literatur ist beschrieben, dass überexprimiertes Hrd1 unabhängig von Usa1 Oligomere ausbilden kann [73]. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein ähnliches Verhalten auch für Der1 zu beobachten ist. *DER1* ist ein Zielgen der UPR (*unfolded protein response*) und wird daher bei ER-Stress hochreguliert [37]. Die UPR kann durch eine Behandlung der Zellen mit dem Reduktionsmittel DTT aktiviert werden. Die reduzierende Wirkung von DTT führt zur Hydrolyse der Disulfidbrücken in Proteinen und

verhindert dadurch eine korrekte Proteinfaltung. Eine UPR-Induktion kann auch durch eine Blockierung des Proteinabbaus im ER in einer $\Delta hrd1 \Delta doa10$ -Doppelmutante ausgelöst werden.

Die Erhöhung des Expressionslevels von Der1 nach UPR-Induktion durch DTT sowie eine Deletion der beiden ERAD-Ubiquitinligasen *HRD1* und *DOA10* ermöglichte eine Usa1-unabhängige Oligomerisierung von Der1 (Abb. 3.17 (A)). Allerdings war die Oligomerisierung leicht reduziert im Vergleich zur wt-Situation, was den stabilisierenden Effekt von Usa1 auf das Der1-Oligomer unterstreicht. Um deutlich zu machen, dass die wiederhergestellte Oligomerisierung in $\Delta usa1$ -Zellen tatsächlich auf eine erhöhte Proteinmenge von Der1 unter ER-Stressbedingungen zurückzuführen ist, wurde die Aktivierung der UPR durch eine Deletion von *IRE1* verhindert. Unter diesen Bedingungen konnte eine Usa1-unabhängige Selbstoligomerisierung von Der1 in $\Delta hrd1 \Delta doa10$ -Zellen nicht mehr beobachtet werden (Abb. 3.17 (B)). Anschließend sollte durch Verwendung der C-terminal verkürzten Der1-Versionen festgestellt werden, ob die Der1-Selbstoligomerisierung durch den C-Terminus vermittelt wird. Wie aus Abb. 3.17 (C) ersichtlich wird, hatte weder die Verkürzung noch die Deletion des gesamten C-Terminus einen Einfluss auf die Selbstoligomerisierung von Der1. Dies lässt vermuten, dass die Selbstoligomerisierung über die TM-Bereiche von Der1 erfolgt.

3.3.7 Die Oligomerisierung der HRD-Ligase ist nicht notwendig für den Abbau des luminalen ERAD-Substrats CPY*

Da die Komponenten der HRD-Ligase oligomere Strukturen ausbilden, ergab sich die Fragestellung, ob die Oligomerisierung für die Funktion des Abbaukomplexes notwendig ist. Hierzu wurde mithilfe eines *Pulse Chase*-Experiments der Abbau des luminalen ERAD-Substrats CPY* und des Membranproteins 6xMyc-Hmg2 in den N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten getestet.

Die Deletion des gesamten N-Terminus verhindert nicht nur eine Oligomerisierung des Abbaukomplexes, sondern hebt auch die Bindung zu Hrd1 auf und führt daher zu einem starken Abbaufekt von CPY* und 6xMyc-Hmg2 (Abb. 3.18 (A)). Dagegen hatte die Usa1 ($\Delta 372-418$)-6xHA-Mutante, die zwar eine Assemblierung der HRD-Ligase erlaubt, allerdings defekt in der Oligomerisierung des Abbaukomplexes ist, nur einen schwachen Einfluss auf den CPY*-Abbau. In Bezug auf die Proteolyse von CPY* verhielt sich die Usa1 ($\Delta 372-418$)-6xHA-Mutante damit ähnlich wie die Usa1 ($\Delta 259-312$)-6xHA-Mutante, die die Der1- und Hrd1-Oligomerisierung nicht beeinflusst. Somit scheint die Oligomerisierung der HRD-Ligase zumindest für die Proteolyse des luminalen ERAD-Substrats CPY* nicht notwendig zu sein. Der leicht verzögerte Abbau in den beiden Usa1-Mutanten (Usa1 ($\Delta 372-418$)-6xHA und Usa1 ($\Delta 259-312$)-6xHA) ist vermutlich auf das 6xHA-Epitop zurückzuführen, da auch für das 6xHA-markierte Volllänge-Usa1 ein leichter Abbaufekt erkennbar war. Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil Beobachtungen aus früheren

Arbeiten, in denen von einer Funktion der Hrd1-Oligomerisierung für den CPY*-Abbau berichtet wurde [73]. Die Beobachtungen basierten auf Abbaupersonen mit der Usa1 ($\Delta 319-418$)-6xHA-Mutante, die auch in dieser Arbeit eine Verzögerung des CPY*-Abbaus verursachte. Wie in Abb. 3.16 (A) zu erkennen ist, wurde allerdings unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen Usa1 ($\Delta 319-418$)-6xHA wesentlich schwächer exprimiert als wt-Usa1 oder Usa1 ($\Delta 372-418$)-6xHA. Daher ist der Abbaufekt der Usa1 ($\Delta 319-418$)-6xHA-Mutante eher auf die reduzierte Proteinmenge von Usa1 als auf eine beeinträchtigte Oligomerisierung der HRD-Ligase zurückzuführen. Im Gegensatz zu CPY* war der Abbau des Membranproteins 6xMyc-Hmg2 in den N-terminalen Deletionsmutanten deutlich verzögert (Abb. 3.18 (B)). Dies lässt auf eine Funktion der oligomeren HRD-Ligase beim Abbau membranständiger ERAD-Substrate schließen, was mit den Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt [22,55,101].

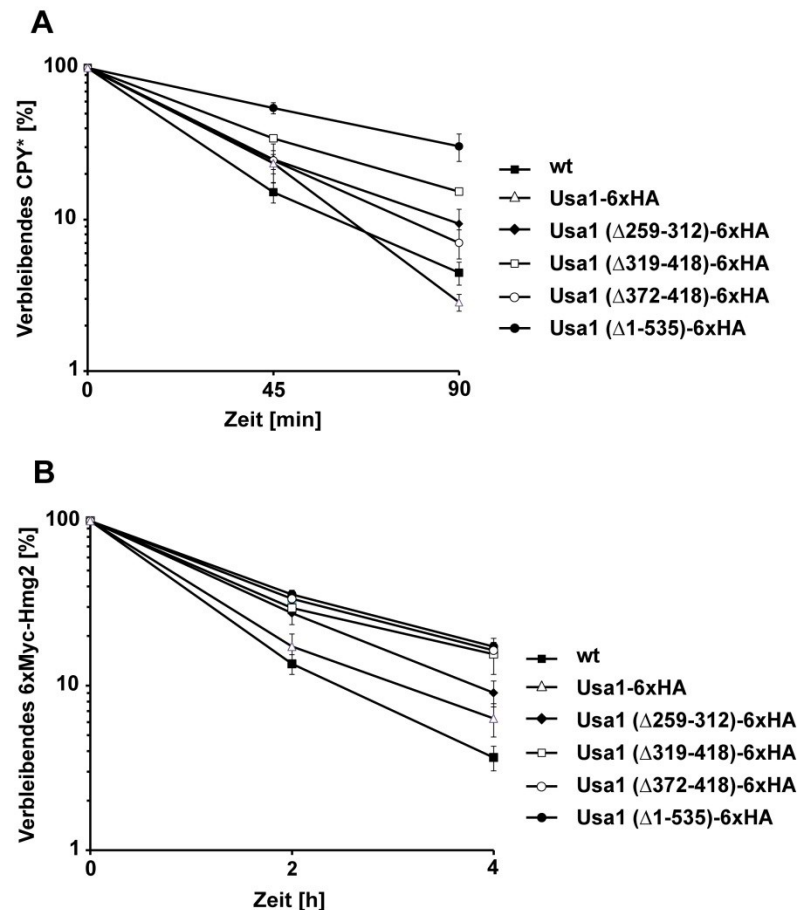


Abb. 3.18: Einfluss der N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten auf den Abbau luminaler und membranständiger ERAD-Substrate. Pulse Chase-Experiment zur Quantifizierung des CPY*-Abbaus in den N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten (A). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen. Anschließend wurde CPY* nach erfolgter Zellyse mithilfe eines spezifischen Antikörpers unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Pulse Chase-Experiment zur Quantifizierung des Abbaus von 6xMyc-Hmg2 in den N-terminalen Usa1-Deletionsmutanten (B). 6xMyc-Hmg2 wurde endogen in den Usa1-Deletionsmutanten exprimiert und mit einem monoklonalen α -Myc-Antikörper präzipitiert. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung vom Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

3.3.8 Ein Hrd1-Usa1C-Fusionsprotein kann den CPY*-Abbaudefekt in $\Delta usa1$ -Zellen nicht komplementieren

Wie aus Abschn. 3.3.7 hervorgeht, ist die durch Usa1 vermittelte Oligomerisierung der HRD-Ligase für den Abbau luminaler ERAD-Substrate wie CPY* nicht notwendig. Es sollte daher untersucht werden, ob bereits die Rekrutierung von Der1 zur Ubiquitinligase Hrd1 ausreicht, um den Abbau von CPY* zu ermöglichen. Hierzu wurde ein Fusionsprotein bestehend aus Volllänge-Hrd1 und dem Usa1 C-Terminus generiert (Abb. 3.19). Der Usa1 C-Terminus bindet Der1 und kann es dadurch in $\Delta usa1$ -Zellen stabilisieren. Zunächst sollte das Fusionsprotein in Bezug auf die Funktionsfähigkeit und die Interaktion mit Der1 charakterisiert werden.



Abb. 3.19: Schematische Darstellung des Hrd1-Usa1C-Fusionsproteins. Der Usa1 C-Terminus (584-838) wurde an den C-terminalen Bereich des Volllänge-Hrd1 (1-551) fusioniert.

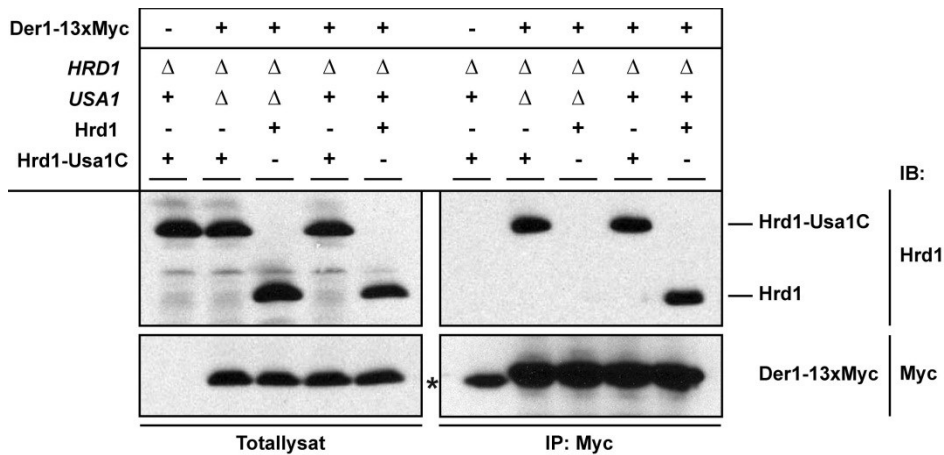


Abb. 3.20: Hrd1-Usa1C interagiert direkt mit Der1-13xMyc. Plasmid-codiertes wt-Hrd1 oder Hrd1-Usa1C wurde in *HRD1*-Deletionsmutanten transformiert, die endogen Der1-13xMyc exprimieren. Der1-13xMyc wurde in einer Ko-IP präzipitiert und die Hrd1-Varianten mit einem spezifischen α -Hrd1-Antikörper im Immunoblot detektiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

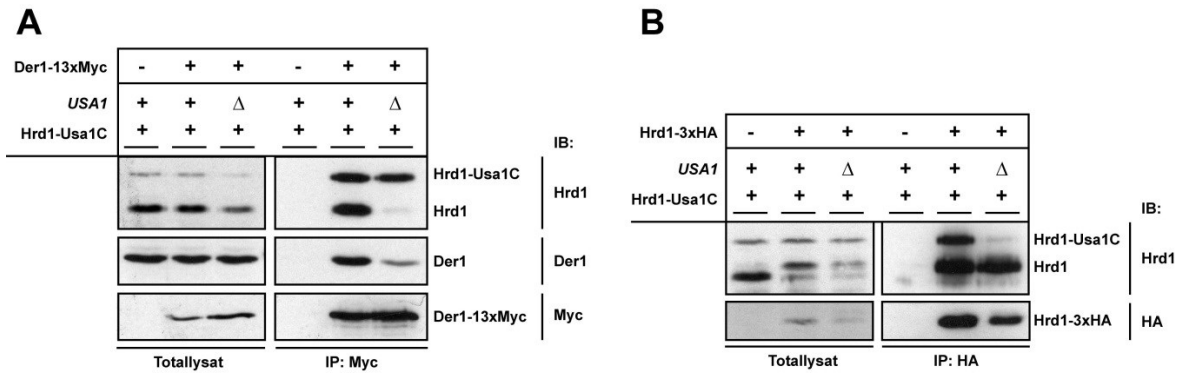


Abb. 3.21: Die Oligomerisierung von Der1 und Hrd1 kann durch die Expression von Hrd1-Usa1C nicht induziert werden. Ko-IP zur Analyse der Der1-Oligomerisierung nach Expression des Hrd1-Usa1C-Fusionsproteins (A). Endogenes Der1-13xMyc wurde mit Plasmid-codiertem wt-Der1 und Hrd1-Usa1C ko-exprimiert und in einer nachfolgenden Ko-IP präzipitiert. Ko-IP zur Analyse der Hrd1-Oligomerisierung nach Expression des Hrd1-Usa1C-Fusionsproteins (B). Endogenes Hrd1-3xHA wurde mit Plasmid-codiertem Hrd1-Usa1C ko-exprimiert und die Epitop-markierte Hrd1-Variante mittels monoklonaler α-HA-Antikörper präzipitiert.

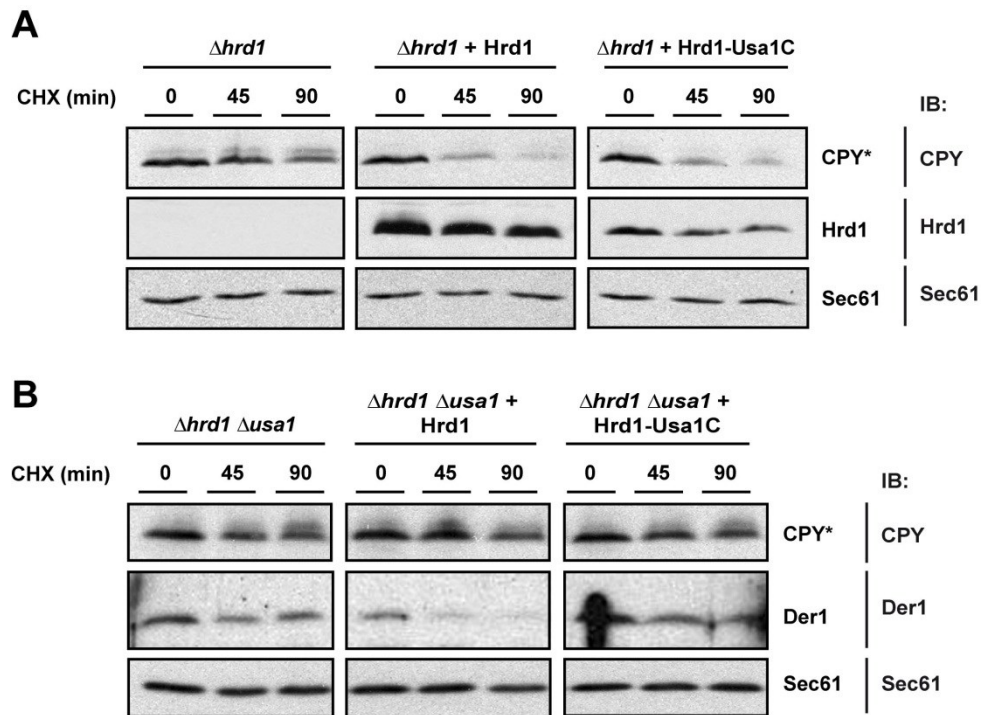


Abb. 3.22: Stabilität und Funktionalität des Hrd1-Usa1C-Fusionsproteins. Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Stabilität von Hrd1-Usa1C und Komplementierung des CPY*-Abbaudefekts in $\Delta hrd1$ -Zellen (A). Plasmid-codiertes wt-Hrd1 oder Hrd1-Usa1C wurde in $\Delta hrd1$ -Zellen transformiert und die Stabilität von CPY* sowie des Fusionsproteins über einen Zeitraum von 90 min analysiert. Cycloheximid-Experiment zur Analyse der Komplementierung des CPY*-Abbaudefekts durch Hrd1-Usa1C in $\Delta hrd1 \Delta usa1$ -Zellen (B). Plasmid-codiertes wt-Hrd1 oder Hrd1-Usa1C wurde in $\Delta hrd1 \Delta usa1$ -Zellen transformiert und die Stabilität von CPY* über einen Zeitraum von 90 min analysiert.

Hrd1-Usa1C konnte mit Der1-13xMyc in Abwesenheit von Usa1 ko-präzipitiert werden, während eine direkte Interaktion mit wt-Hrd1 nicht möglich war (Abb. 3.20). Die Bindung des Hrd1-Usa1C-Fusionsproteins stabilisierte Der1 im $\Delta usa1$ -Hintergrund (Abb. 3.22 (B)), was schließlich mit Ergebnissen zur Expression des Usa1 C-Terminus (Abschn. 3.1.2) korreliert. Ebenso wurde anhand eines Cycloheximid-Experiments gezeigt, dass das Fusionsprotein stabil ist und die Deletion von *HRD1* hinsichtlich des CPY*-Abbaus komplementiert (Abb. 3.22 (A)). Dagegen konnten durch die Expression von Hrd1-Usa1C in $\Delta usa1$ -Zellen weder Der1 noch Hrd1 Oligomere ausbilden, da die Oligomerisierung der HRD-Ligase durch den Usa1 N-Terminus vermittelt wird (Abb. 3.21 (A, B)). Um zu testen, ob das Fusionsprotein neben Hrd1 auch Volllänge-Usa1 komplementieren kann, wurde Hrd1-Usa1C in $\Delta hrd1 \Delta usa1$ -Zellen exprimiert und der CPY*-Abbau analysiert. In Abb. 3.22 (B) ist zu erkennen, dass durch eine Expression von Hrd1-Usa1C der CPY*-Abbau weiterhin blockiert war. Daraus folgt, dass die Rekrutierung von Der1 an die Ubiquitinligase Hrd1 nicht ausreicht, um einen funktionsfähigen Abbaukomplex auszubilden. Nach einer Charakterisierung der Integration von Der1 in die HRD-Ligase sollte durch weitere Experimente die Funktion von Der1 im Abbaukomplex untersucht werden.

3.4 Einordnung von Der1 in die Abbaukaskade der HRD-Ligase

Der1 wurde bereits in früheren Arbeiten als essentielle Komponente der HRD-Ligase für den Abbau luminaler ERAD-Substrate beschrieben [56]. Dennoch ist bisher unklar, wie Der1 mechanistisch zum Abbau beiträgt und in welchem Schritt der Qualitätskontrolle Der1 beteiligt ist. Da Der1 unabhängig von Hrd3 Substrate wie CPY* binden kann [35], wird unter anderem vermutet, dass Der1 gemeinsam mit Hrd3 in der Substratrekrutierung zur HRD-Ligase involviert ist. Um weitere Hinweise für eine gemeinsame Funktion von Der1 und Hrd3 bei der Substratbindung zu erhalten, wurde mittels *Pulse Chase*-Experiment der Abbau von CPY* in $\Delta der1$ - und $\Delta hrd3$ -Zellen sowie in einer $\Delta der1 \Delta hrd3$ -Doppelmutante untersucht.

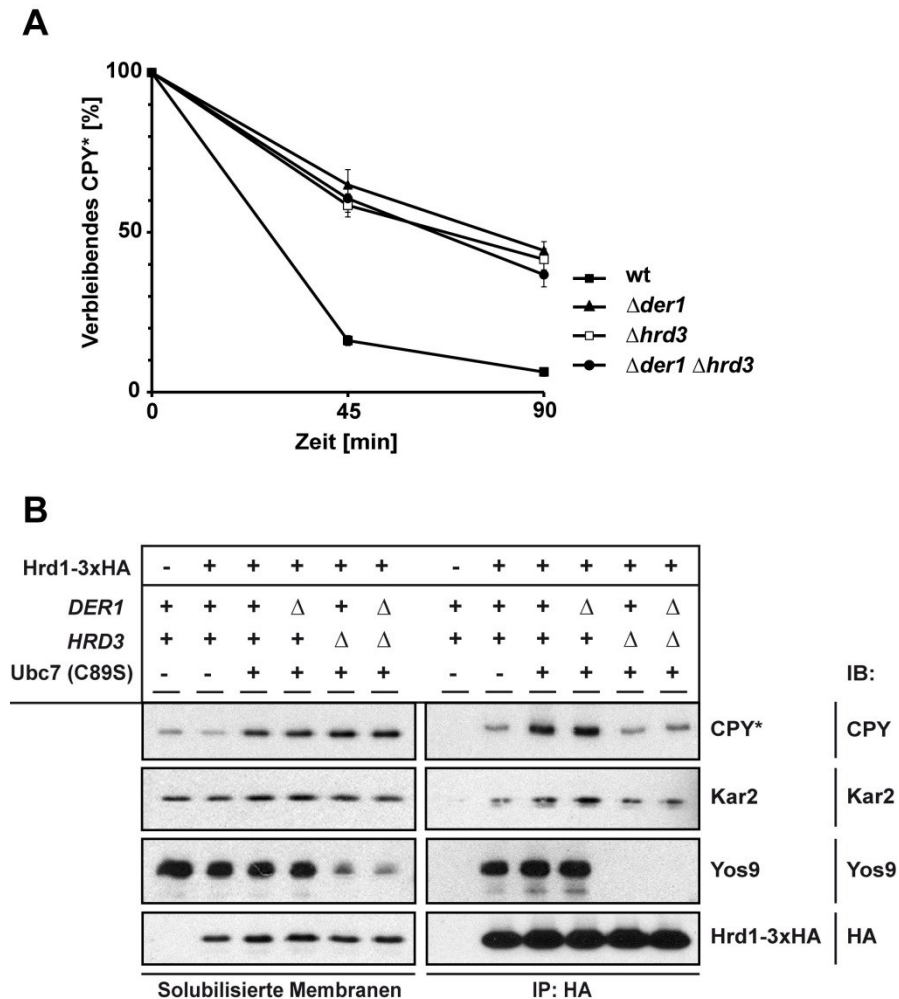


Abb. 3.23: Einfluss der *DER1*- und *HRD3*-Deletionsmutanten auf den Abbau und die Wechselwirkung von CPY* mit der HRD-Ligase. Pulse Chase-Experiment zur Quantifizierung des CPY*-Abbaus in *DER1*- und *HRD3*-Deletionsmutanten (A). Nach der Zellyse wurde CPY* mit einem α -CPY-Antikörper präzipitiert. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ko-IP zum Einfluss der *DER1*- und *HRD3*-Deletionsmutanten auf die Substratrekrutierung zur HRD-Ligase (B). Nach einer Lyse der Hefezellen wurden Mikrosomen präpariert und die Membranproteine in NP40-Puffer solubilisiert. Hrd1-3xHA wurde mittels monoklonaler α -HA-Antikörper präzipitiert und die interagierenden Komponenten im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Die Deletion von *DER1* und *HRD3* verzögerte den Abbau gleichermaßen (Abb. 3.23 (A)). Dagegen hatte die Deletion beider Faktoren in der $\Delta der1 \Delta hrd3$ -Doppelmutante keinen zusätzlich hemmenden Effekt auf den CPY*-Abbau, was eine voneinander unabhängige Funktion von Der1 und Hrd3 bei der Substratrekrutierung unwahrscheinlich macht. Um eine Beteiligung von Der1 an der Substratbindung weiter zu überprüfen, wurde 3xHA-markiertes Hrd1 präzipitiert und die Menge an gebundenen CPY* in Abhängigkeit von Der1 und Hrd3 untersucht. Da Hrd1 in Abwesenheit von Hrd3 instabil ist, wurde das Experiment in der katalytisch inaktiven Ubc7 (C89S)-Mutante durchgeführt. Die Blockierung des Abbaus an der HRD-Ligase durch die Mutation von Ubc7 führt außerdem zu einer Angleichung der CPY*-Proteinmengen in den verschiedenen Deletionsmutanten. In

Abwesenheit von Hrd3 wurde wesentlich weniger CPY* an die HRD-Ligase gebunden, während die Deletion von *DER1* keinen Einfluss auf die Substratrekrutierung hatte (Abb. 3.23 (B)). Die Rekrutierung der beiden Substraterkennungsfaktoren Yos9 und Kar2 zur Ubiquitinligase wurde ebenfalls nicht durch die Deletion von *DER1* beeinträchtigt. Diese Ergebnisse deuten letztendlich darauf hin, dass Der1 keine wesentliche Rolle bei der Substratbindung und -erkennung spielt, sondern eher an einem nachgeschalteten Schritt im Abbauprozess der HRD-Ligase beteiligt ist. Im Folgenden sollten für eine weitere funktionelle Charakterisierung von Der1 die Bereiche des Proteins identifiziert werden, die beim Abbau von Der1-Substraten beteiligt sind.

3.5 Mutagenese der Der1 Transmembrandomänen

3.5.1 Zielgerichtete Punktmutagenese von Der1

Biochemische Untersuchungen zur Topologie von Der1 sowie das Hydropathie-Diagramm des Proteins postulieren, dass Der1 vier TM-Domänen aufweist [54]. Mit einem Molekulargewicht von 24 kDa besteht Der1 damit zum großen Teil aus TM-Segmenten. Dies wirft die Frage auf, ob die zahlreichen TM-Domänen nur zur Verankerungen von Der1 in der ER-Membran dienen oder ob sie auch eine bestimmte Funktion im Abbaukomplex ausfüllen. Ein Sequenzvergleich von Der1 mit homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen zeigt, dass vor allem die erste und die zweite TM-Domäne einige konservierte hydrophile Aminosäuren enthalten (Abb. 3.24). Die vierte TM-Domäne besteht ebenfalls aus mehreren hydrophilen Aminosäuren, die allerdings nicht so stark konserviert sind wie diejenigen der ersten und zweiten TM-Domäne. Um die Bedeutung der konservierten hydrophilen Aminosäuren für die Funktionalität von Der1 zu analysieren, wurden diese gegen Alanin oder Leucin ausgetauscht. Die zielgerichtete Punktmutagenese von Der1 konzentrierte sich vor allem auf Aminosäuren in der ersten und zweiten TM-Domäne sowie auf weitere konservierte Aminosäuren in den luminalen und zytosolischen Bereichen des Proteins. Zur Charakterisierung der generierten Der1-Punktmutanten wurde sowohl die Der1-Stabilität und der Abbau von CPY* als auch die Fähigkeit, mit Usa1 zu interagieren und Oligomere auszubilden, untersucht. Das Ergebnis der Charakterisierung der verschiedenen Der1-Mutanten ist in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Derlin-1_hs	--MSDIGDWFRSIPAITRYWFAATVAVPLVGKLGILSPAYLFLWPEAFLYRFQIWRPITA	58
Derlin-1_ce	---MDLENFLLGIPIVTRYWFLASTIIPLLGRFGFINVQWMFLQWDLVVNKFQWRPLTA	57
Derlin-3_hs	MAWQGLAAEFLLQVPAVTRAYTAACVLTTAAVQLELLSPFQLYFNPHLVFRKFQVWRLVTN	60
Derlin-3_mm	MAGQRLAAGFLQVPAVTRAYTAACVLTTAAVQLELLSPFQLYFNPHLVFRKFQVWRLITT	60
Derlin-2_hs	MAYQSLRLEYLQIPVSRAYTTACVLTTAAVQLELITPFQLYFNPELIFKHFOIWRLLITN	60
Derlin-2_ce	--MNGVVAALEEMPVTRFYTGACVLLTTAVHLEFVTFPHLYFNWELIIRKYQFWRLITS	58
Der1_sc	-MDAVILNLLGDIPLVTRLTWITGCLVLSGLTSLRIVDPGKVVYSYDLVFKKGQYGRLLYS	59
	TM 1	
Derlin-1_hs	TFYFPVGPFGTGLYLVLNLYFLYQYSTRLETGAFDGRPADYLFMLLFNWICIVITGLAMDM	118
Derlin-1_ce	LIYYPVTPQTGFHWMCMCYFLYNYSKALESETYGRSADYLFMLIFNWFFCSGLCMALDI	117
Derlin-3_hs	FLFFGP---LGFSFFFNMLFVFRYCRMLEEGSFRGRADVFVFMFLFGGVLMTLGLLGS	117
Derlin-3_mm	FLFFGP---LGFGFFFNMLFVFRYCRMLEEGSFRGRKADVFVFMFLFGGVLMTLGLLGS	117
Derlin-2_hs	FLFFGP---VGFNFLFMIFLYRYCRMLEEGSFRGRADVFVFMFLFGGVLMTLFGLFVSL	117
Derlin-2_ce	FCFFGS---FGFSFLFMIFTYRYCMMLEEGSFRGRADVFVFMFLFGAVLMILSGIFVQI	115
Der1_sc	IFDYGA---FNWISMINIFVSNHLSLENSFNLRKFCWIIIFLLVILVKMTSIEQPA	115
	TM 2	TM 3
Derlin-1_hs	QLMIPLIMSVLYVWAQLN-RDMIVSFWFGTRFKACYLPWVILGFNYIIGGSVINELIG-	176
Derlin-1_ce	YFLLEPMVISVLYVWCQVN-KDTIVSFWFGMRFPARYLPWVLWGFAVLRGGGTNELVG-	175
Derlin-3_hs	FFLGQALMAMLVYVWSRRS-PRVRVNFGLLTFQAPFLPWALMGFSLLLGNLSILVDLLG-	175
Derlin-3_mm	FFLGQALMAMLVYVWSRRS-PHVRVNFGLLNFQAPFLPWALMGFSLLLGNSSVVDLLG-	175
Derlin-2_hs	VFLGQAFTIMLVYVWSRRN-PYVRMNFGLLNFQAPFLPWLMGFSLLLGNLSIIVDLLG-	175
Derlin-2_ce	LFLGQAFTIMLVYIWSRRN-PMIQMNFGLVLTFTAPYLPWVLLLSLLLGNNAVDFMG-	173
Der1_sc	ASLGVLLHENLVYELKKNQNMNVRFFGAIDVSPSIFPIYMNAMVYFVYKRSWLEIAMN	175
	TM 4	
Derlin-1_hs	NLVGHLYFFFLMFRYPMDLGRNFLSTPQFLYRWLPSRRGGVSGFGVPPASMRRAADQNGG	236
Derlin-1_ce	ILVGHAYFFVALKYPDEYG-VDLISTPEFLHRLIPDEDGGIHHGQ----DGNIRGARQQPR	230
Derlin-3_hs	IAVGHIIYFFLEDVFPNQPGGKRLLTQPGFLGLQSSKAPAGSSLT-----IWTQQSQG	227
Derlin-3_mm	ILVGHIIYFFLEDVFPNQPGGKRLLTQPGFLGLQSSKAPAGSSLT-----PLPEEQP-	226
Derlin-2_hs	IAVGHIIYFFLEDVFPNQPGGIRILKTPSILKAIKIFDTPDEDPNYN-----PLPEERPG	227
Derlin-2_ce	IACGHIIYFFLEDVFPQEHGKRFKTPQWLVLFDERRPEP-----LPEDERPG	222
Der1_sc	FMPGHVIYMDDIIGKIYG-IDLCKSPYDWRNTETP-----	211
Derlin-1_hs	GGRHNWQGFR LGDQ	251
Derlin-1_ce	GHQWPGGVGARLGGN	245
Derlin-3_hs	PGTAGELAAPS---	239
Derlin-3_mm	-----EL-----	228
Derlin-2_hs	GFAWGEGQRLGG---	239
Derlin-2_ce	GFEWGDEQPEQE QHD	237
Der1_sc	-----	

Abb. 3.24: Vergleich der Aminosäuresequenz von Der1 mit Homologen aus verschiedenen Organismen und Markierung der in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren. Derlin-1 aus *Homo sapiens* (hs, Q9BUN8 (UniProtKB accession number)), *Caenorhabditis elegans* (ce, Q93561), Derlin-2 aus *Homo sapiens* (hs, Q9GZP9), *Caenorhabditis elegans* (ce, Q21997), Derlin-3 aus *Homo sapiens* (hs, Q96Q80), *Mus Musculus* (mm, Q9D8K3), Der1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (sc, P38307). Die Ähnlichkeit der Sequenzbereiche wird durch die unterschiedliche Blaufärbung wiedergegeben. Schwarze Rauten = mutierte Aminosäuren. Bestimmte Aminosäuren sind farbig markiert: Mutationen, die zu einem Abbaudefekt führen = rot; Mutationen, die Der1 destabilisieren = gelb. Der Sequenzvergleich wurde mithilfe von ClustalW und Jalview erstellt.

Tab. 3.1: Charakterisierung der generierten Der1-Punktmutanten. Die Der1-Punktmutanten wurden in Hinblick auf ihre Stabilität, den CPY*-Abbau und teilweise auch auf die Fähigkeit, Oligomere zu bilden und mit Usa1 zu interagieren, untersucht. Die Mutation rot markierter Aminosäuren führt zu einer Verzögerung des Abbaus von CPY*. Nicht bestimmt = n.b.

Aminosäure	Der1-Stabilität	CPY*-Abbau	Usa1-Interaktion	Der1-Oligomerisierung
T16A	+	+	n.b.	n.b.
R17L	+	–	+	+
C23L	+	–	+	+
P37A	+	+	n.b.	n.b.
G38W	+	+	n.b.	n.b.
D45A	+	+	n.b.	n.b.
L46A	+	+	n.b.	n.b.
K49A	+	+	n.b.	n.b.
K50A	+	+	n.b.	n.b.
Q52A	+	+	n.b.	n.b.
R55A	+	+	n.b.	n.b.
Y58L	+	+	n.b.	n.b.
S59L	– –	– –	n.b.	n.b.
S70A	+	+	n.b.	n.b.
N73L	+	–	+	+
S77L	+	+	n.b.	n.b.
LEN84-86AAA	– –	– –	+	+
R91A	+	+	n.b.	n.b.
Y128A	+	+	n.b.	n.b.
P154A	+	+	n.b.	n.b.
GH179/180LA	– –	– –	– –	– –
YY183/184AA	–	–	–	–
DD186/187AA	+	+	+	+
P201A	+	+	+	+

Die Mutation einiger konservierter Aminosäuren in der ersten (R17 und C23) und zweiten (N73) TM-Domäne führte zu einer Stabilisierung von CPY*. Des Weiteren kam es durch die Mutation konservierter Aminosäuren im C-Terminus (GH179/180 und YY183/187) zum Verlust der Usa1-Interaktion und dadurch zum Abbau von Der1. Die C-terminalen Usa1-Interaktionsmutanten wurden bereits im Abschn. 3.2.3 ausführlich charakterisiert. Die Mutation eines Serins (S59) in der zweiten TM-Domäne oder eines Blocks aus drei zum Teil konservierten Aminosäuren in der zytosolischen Schleife (LEN84-86) bewirkte eine Destabilisierung von Der1, ohne jedoch die Usa1-Interaktion zu beeinflussen.

3.5.2 Die Mutation der Der1 TM-Domänen inhibiert spezifisch den Abbau löslicher ERAD-Substrate

Nachdem in Vorexperimenten bei einigen TM-Mutanten eine Verzögerung des CPY*-Abbaus festgestellt wurde, sollte mithilfe von *Pulse Chase*-Experimenten zum einen der Abbaudefekt quantifiziert werden. Zum anderen sollte der Einfluss der TM-Mutanten auf die Proteolyse weiterer ERAD-Substrate getestet werden.

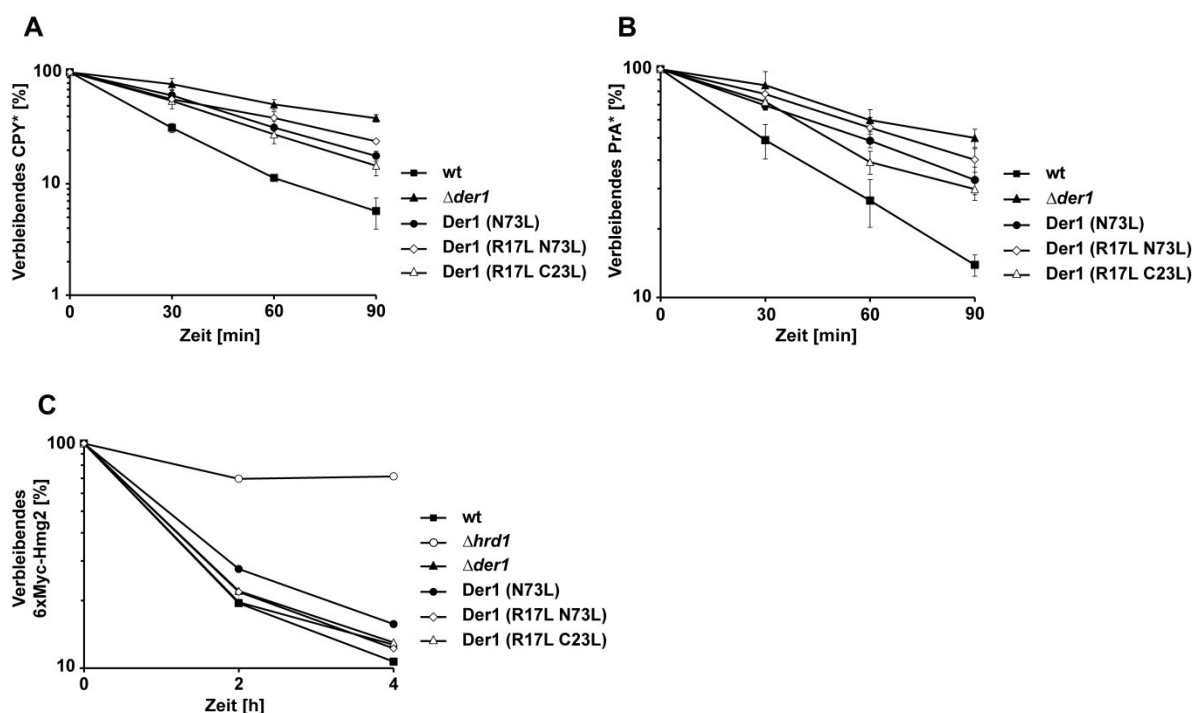


Abb. 3.25: Die Der1 TM-Mutanten inhibieren den Abbau fehlgefalteter luminaler ER-Proteine, während die Halbwertszeit des membranständigen ERAD-Substrats 6xMyc-Hmg2 nicht beeinflusst ist. *Pulse Chase*-Experimente zur Quantifizierung des Abbaus von CPY* (A), PrA* (B) und 6xMyc-Hmg2 (C) in den Der1 TM-Mutanten. Die Präzipitation von CPY* und PrA* erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen CPY und PrA. 6xMyc-Hmg2 wurde mit monoklonalen α -Myc-Antikörpern präzipitiert. Die Fehlerbalken stellen die Abweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Der *Pulse Chase* zum Abbau von 6xMyc-Hmg2 wurde nur einmal durchgeführt.

Die Der1-Doppelmutante (Der1 (R17LC23L)) mit Mutationen ausschließlich in der ersten TM-Domäne zeigte eine signifikante Stabilisierung von CPY* (Abb. 3.25 (A)). Ein vergleichbarer Abbaufekt konnte auch durch die Mutation eines Asparagins (Der1 (N73L)) in der zweiten TM-Domäne erzielt werden. Die Kombination von Mutationen in der ersten und zweiten TM-Domäne (Der1 (R17LN73L)) führte schließlich zu der stärksten Beeinträchtigung des CPY*-Abbaus. Als weiteres luminales ERAD-Substrat wurde der Abbau von PrA* in den TM-Mutanten untersucht. In Abb. 3.25 (B) ist zu erkennen, dass der PrA*-Abbau durch Mutationen in den TM-Domänen in gleichem Maße beeinflusst wurde wie im Fall von CPY*. Im Gegensatz dazu hatte die Expression der Der1 TM-Mutanten wie auch die Deletion von *DER1* keinen Einfluss auf den Abbau des Membranproteins 6xMyc-Hmg2 (Abb. 3.25 (C)). Bei einer Deletion der Ubiquitinligase *HRD1*, über die der Abbau von 6xMyc-Hmg2 erfolgt, war schließlich eine deutliche Stabilisierung des Substrats erkennbar.

3.5.3 Die Stabilität und Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase wird nicht durch die Mutationen in den TM-Domänen beeinflusst

Im Folgenden sollten die Der1 TM-Mutanten, die eine Stabilisierung luminaler ERAD-Substrate hervorrufen, in Bezug auf ihre Integration in die HRD-Ligase charakterisiert werden. Hierzu wurden sowohl die Stabilität als auch die Interaktion zu Usa1 und die Oligomerbildung der TM-Mutanten untersucht.

Mithilfe eines Cycloheximid-Experiments konnte gezeigt werden, dass die TM-Mutanten stabil sind und ein ähnliches Expressionsniveau wie wt-Der1 aufzeigen (Abb. 3.26). Die Bindung der Der1-Mutanten zu Usa1 und anderen Komponenten der HRD-Ligase wurde durch eine Ko-IP mit 13xMyc-markiertem Der1 ermittelt (Abb. 3.27 (A)). Alternativ wurde Epitop-markiertes Usa1 gefällt und die Assoziation mit den Der1-Mutanten analysiert (Abb. 3.27 (B)). In beiden Experimenten hatten die TM-Mutationen keinen Effekt auf die Interaktion mit Usa1 oder anderen Untereinheiten der HRD-Ligase wie Hrd1 oder Hrd3. Für die Untersuchung der Oligomerbildung wurden Plasmid-codierte Der1 TM-Mutanten mit endogenem Der1-13xMyc ko-exprimiert und die Interaktion der beiden Der1-Varianten durch eine Ko-IP festgestellt. Während die Deletion von *USA1* die Oligomerbildung stark beeinträchtigte, hatten die Mutationen in den TM-Domänen keinen Einfluss auf die Der1-Oligomerisierung (Abb. 3.28). Allerdings zeigten die verschiedenen TM-Mutanten im Vergleich zum wt-Der1 ein leicht verändertes Migrationsverhalten in der SDS-PAGE, was auf strukturelle Veränderungen des Proteins hindeutet. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Mutationen in den TM-Domänen weder die Stabilität noch die Integration von Der1 in die HRD-Ligase störten.

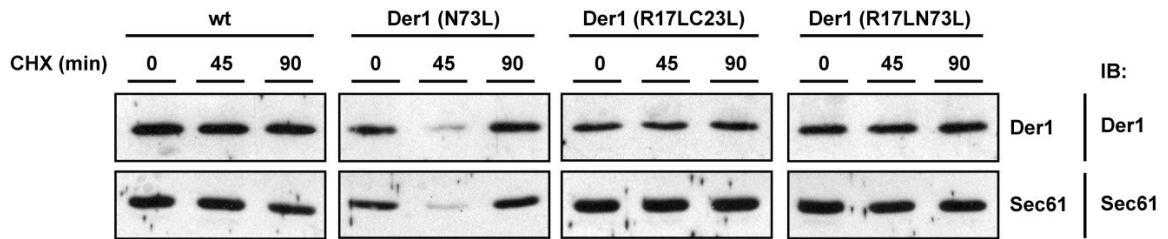


Abb. 3.26: Cycloheximid-Experiment zur Stabilität und Expression der Der1 TM-Mutanten. Die verschiedenen Der1 TM-Mutanten wurden endogen exprimiert und die Proteinmenge über einen Zeitraum von 90 min analysiert. Als Ladekontrolle diente Sec61. Bei der Probenpräparation des 45 min -Zeitwerts der Der1 (N73L)-Mutante ist das Lysat zum großen Teil verlorengegangen, so dass sowohl für Der1 als auch für die Ladekontrolle Sec61 nur ein schwaches Signal im Immunoblot detektiert werden konnte.

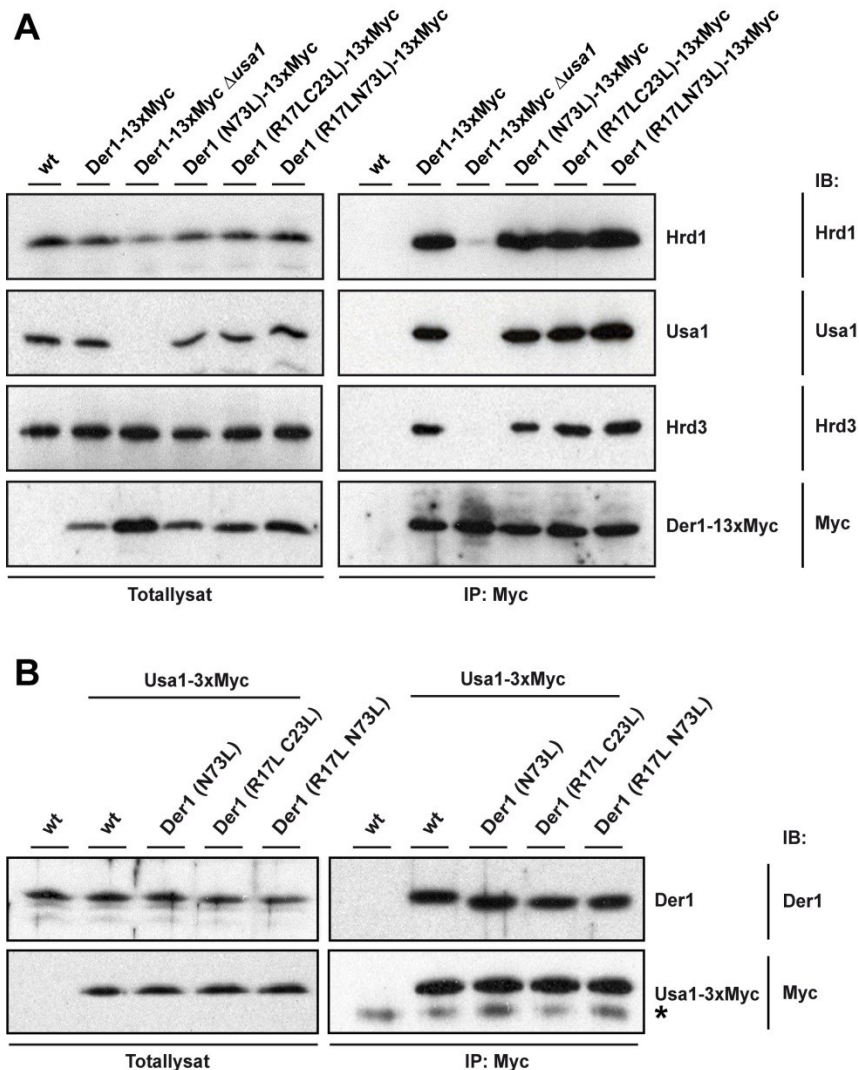


Abb. 3.27: Einfluss der TM-Mutationen auf die Integration von Der1 in die HRD-Ligase. Endogen exprimierte Der1 TM-Mutanten wurden mit einem 13xMyc-Epitop markiert und anschließend mit monoklonalen α -Myc-Antikörpern in einer Ko-IP gefällt. Die Detektion der HRD-Ligase-Komponenten erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern (A). In einer weiteren Ko-IP wurde endogen exprimiertes Usa1-3xMyc präzipitiert und die Interaktion zu den ebenfalls endogen exprimierten TM-Mutanten im Immunoblot mit einem spezifischen α -Der1-Antikörper detektiert (B). * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

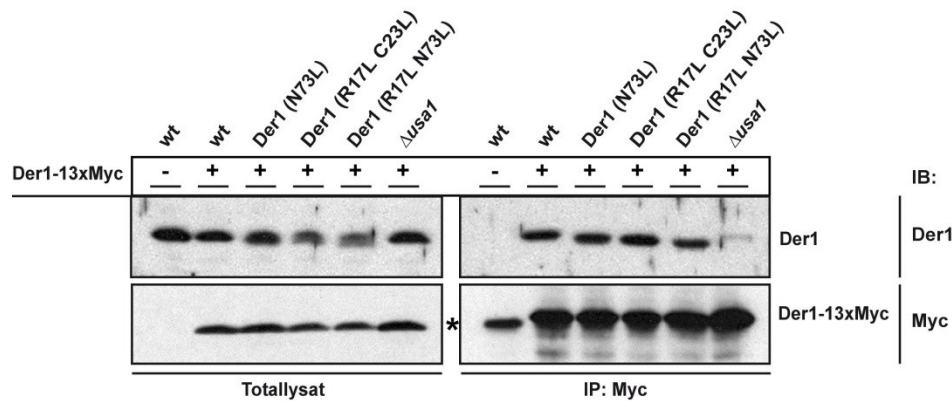


Abb. 3.28: Einfluss der TM-Mutationen auf die Der1-Oligomerisierung. Hefestämme, die endogen Der1-13xMyc exprimieren, wurden mit Plasmid-codierten Der1 TM-Mutanten transformiert und einer Ko-IP mit monoklonalen α -Myc-Antikörpern unterzogen. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

3.5.4 Die Der1 TM-Mutanten blockieren den Export von CPY* aus dem ER-Lumen in das Zytosol

Zur weiteren Charakterisierung der Der1 TM-Mutanten sollte festgestellt werden, ob die Mutationen in den TM-Domänen den Export luminaler ERAD-Substrate in das Zytosol beeinträchtigen. Hierzu wurde ein Proteinase K-Sensitivitäts-Experiment für CPY* mit isolierten Mikrosomen durchgeführt. Um die Dislokation einer bestimmten CPY*-Population beobachten zu können, wurde zunächst die Proteinsynthese durch Behandlung der Hefezellen mit Cycloheximid gehemmt. Der Export und Abbau dieser CPY*-Population wurde für eine Zeitdauer von einer Stunde ermöglicht. Anschließend wurden Mikrosomen präpariert und mit Proteinase K behandelt.

Als Kontrolle für die Integrität der Mikrosomen wurde die Proteinase K-Sensitivität des ER-luminalen Proteins Kar2 getestet. Die Resistenz von Kar2 gegenüber der Behandlung mit Proteinase K zeigte, dass die präparierten Mikrosomen intakt waren (Abb. 3.29). Zur Überprüfung der Proteinase-Aktivität wurden die Mikrosomen durch Behandlung mit dem Detergenz Triton X-100 solubilisiert und die luminalen Proteine des ER auf diese Weise der Proteolyse ausgesetzt. Bei allen Versuchsansätzen führte die Auflösung der Membran durch Triton X-100 zu einem deutlichen Anstieg der Proteinase K-Sensitivität luminaler ER-Proteine wie CPY* und Kar2, was die Aktivität des eingesetzten Enzyms belegt. In wt-Zellen waren ein schneller Abbau und eine hohe Proteinase K-Sensitivität des Substrats CPY* zu erkennen. Dagegen führte die Deletion von *DER1* zu einer deutlichen Stabilisierung und reduzierten Proteinase K-Sensitivität von CPY*. Auch in der Der1 (R17LN73L)-Mutante war die CPY*-Fraktion nahezu vollständig geschützt vor der Proteolyse durch Proteinase K, was auf eine Akkumulation des Substrats im ER-Lumen hindeutet. Die Expression der Mutanten Der1 (R17LC23L) und Der1 (N73L) führte

ebenfalls zu einer signifikanten Inhibierung des CPY*-Abbaus. Dennoch war hier ein wesentlich kleinerer Anteil der stabilisierten CPY*-Fraktion resistent gegenüber Proteinase K, was vermutlich auf eine Exposition des Substrats zum Zytosol zurückzuführen ist. Dieser partiell gestörte Export korreliert mit dem schwächeren Abbaufekt dieser Mutanten im Vergleich zur Der1 (R17LN73L)-Mutante und der *DER1*-Deletion.

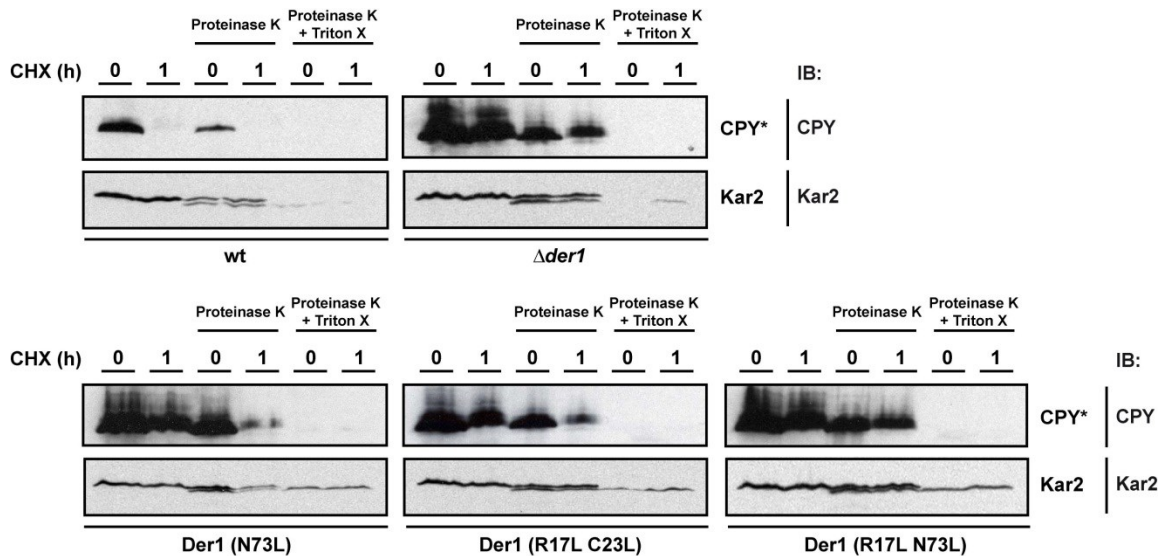


Abb. 3.29: Die Expression der Der1 TM-Mutanten führt zu einer Akkumulation von CPY* im ER-Lumen. Zur Untersuchung des Effekts der Der1 TM-Mutanten auf den Export von CPY* in das Zytosol wurde ein Proteinase K-Sensitivitäts-Experiment durchgeführt. Die TM-Mutanten wurden hierbei endogen exprimiert.

3.5.5 Die Expression der Der1 TM-Mutanten führt zu einer reduzierten Ubiquitinierung von CPY*

Da die Der1 TM-Mutanten den Export des luminalen ERAD-Substrats CPY* beeinflussen, sollte zur Bestätigung dieser Ergebnisse der Effekt der TM-Mutanten auf die Ubiquitinierung von CPY* untersucht werden. Zur Isolierung von ubiquitiniertem CPY* aus dem Zelllysat wurde eine Epitop-markierte Variante dieses Proteins exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen mittels α -Myc-Antikörper präzipitiert. Die Detektion des ubiquitinierten CPY* erfolgte mit einem α -Ubiquitin-Antikörper.

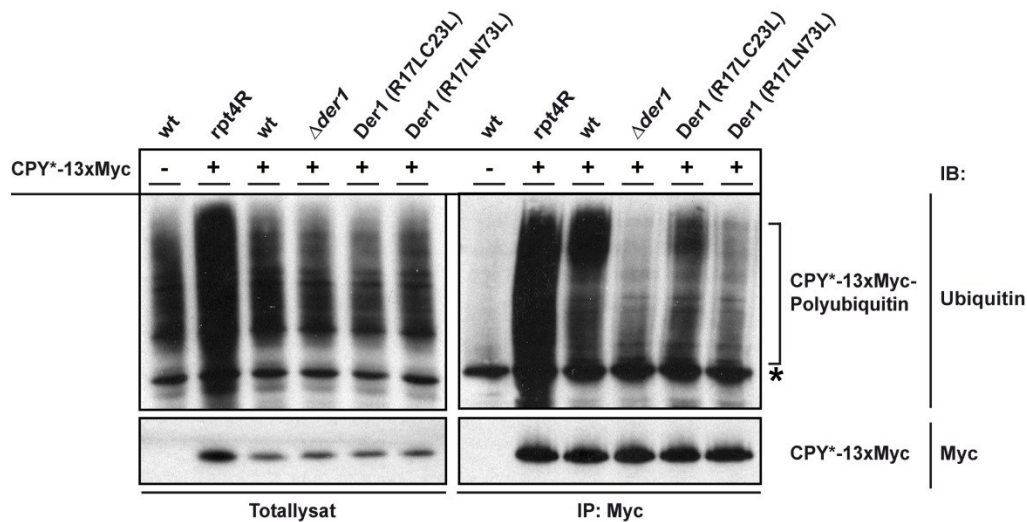


Abb. 3.30: Die Menge an ubiquitiniertem CPY* ist in den Der1 TM-Mutanten reduziert. Um den Einfluss der Der1 TM-Mutanten auf die Ubiquitinierung von CPY* zu untersuchen, wurde CPY*-13xMyc aus dem Gesamtzellextrakt mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert. Anschließend wurde das ubiquitinierte CPY*-13xMyc im Immunoblot mit einem α -Ubiquitin-Antikörper detektiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

Die Menge an ubiquitiniertem CPY* war in der Der1 (R17LN73L)-Mutante sowie in Δ der1-Zellen deutlich reduziert (Abb. 3.30). Da eine Ubiquitinierung von Substraten nur auf der zytosolischen Seite des ER erfolgen kann, stimmt dieses Ergebnis mit dem starken Abbaufekt und der Akkumulation von CPY* im ER-Lumen überein (Abschn. 3.5.4). Dagegen war in der Der1 (R17LC23L)-Mutante noch eine effiziente Substrat-Ubiquitinierung ähnlich wie in wt-Zellen zu beobachten, obwohl CPY* in dieser Mutante deutlich stabilisiert ist. Dies deutet darauf hin, dass der Export von CPY* in der Der1 (R17LC23L)-Mutante nicht vollständig blockiert und das Substrat dadurch Ubiquitin-ligasen im Zytosol ausgesetzt ist, was wiederum mit den Ergebnissen des Proteinase K-Sensitivitäts-Experiments korreliert.

Um zu zeigen, dass das ubiquitinierte CPY* in der Der1 (R17LC23L)-Mutante membran-assoziiert ist, wurden ER-Mikrosomen durch eine Ultrazentrifugation von der zytosolischen Fraktion getrennt und das ubiquitinierte Substrat in beiden Fraktionen mit einem α -Ubiquitin-Antikörper detektiert. Durch die Mutation der proteasomalen Untereinheit Rpt4 kommt es zu einer Anreicherung von ubiquitinierten Substraten im Zytosol. Daher war bei der rpt4R-Mutante eine große Menge an ubiquitiniertem CPY* in der zytosolischen Fraktion erkennbar (Abb. 3.31). Übereinstimmend mit den Ergebnissen zur Substrat-Ubiquitinierung im Gesamtzellextrakt, kam es in den Δ der1-Zellen und in der Der1 (R17LN73L)-Mutante auch in der Membranfraktion zu einer starken Reduktion der CPY*-Ubiquitinierung. Im Gegensatz dazu konnte in den wt-Zellen und in der Der1 (R17LC23L)-Mutante eine deutliche Menge an ubiquitiniertem CPY* beobachtet werden, die membranassoziiert war.

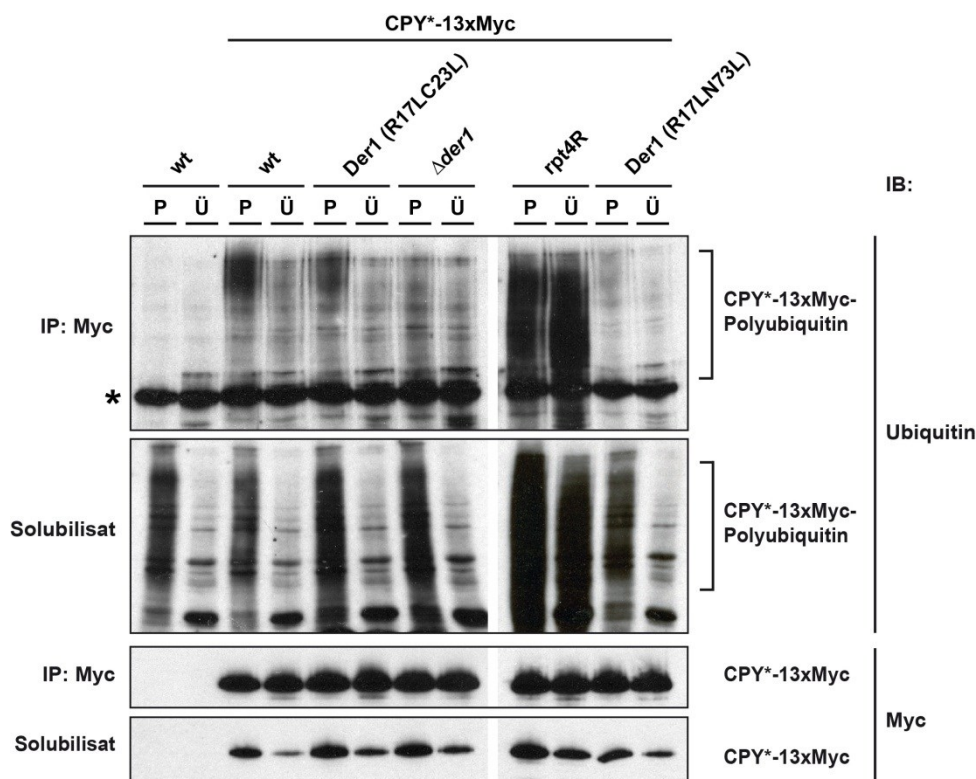


Abb. 3.31: Das ubiquitinierte CPY* in der Der1 (R17LC23L)-Mutante ist membranassoziiert. Nach dem Zellaufschluss wurden die Mikrosomen (P) von der zytosolischen Fraktion (Ü) durch eine Ultrazentrifugation getrennt. Aus beiden Fraktionen wurde CPY*-13xMyc mithilfe von spezifischen Antikörpern präzipitiert und im Immunoblot detektiert. Neben CPY*-13xMyc wurden auch die Der1 TM-Mutanten in beiden Experimenten endogen exprimiert. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper.

3.6 Zielgerichtetes *in vivo* photocrosslinking von Der1

3.6.1 Markierung bestimmter Positionen von Der1 mit dem *Crosslinker* p-Benzoyl-L-Phenylalanin

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde, konnten im Rahmen dieser Arbeit Der1 TM-Mutanten generiert werden, die spezifisch die Dislokation und den Abbau luminaler ERAD-Substrate inhibieren.

Um Hinweise für eine Beteiligung der TM-Domänen beim Transport des Substrats in das Zytosol und damit bei der Ausbildung des ER-Exportkanals zu erhalten, sollte festgestellt werden, ob die TM-Domänen direkt mit dem Substrat interagieren. Dazu wurde die Methode des zielgerichteten *in vivo* photocrosslinking angewendet [96,104]. Zunächst wird Der1 an einer bestimmten Position mit einem photoreaktiven *Crosslinker* markiert, indem das Codon dieser Aminosäure zu einem Stop-Codon mutiert wird (Abb. 3.32). Die Hefezellen, mit denen das *Crosslinking*-Experiment durchgeführt wird, wurden zuvor mit einem Plasmid transformiert, das sowohl eine modifizierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase als auch eine spezielle tRNA codiert. Diese wird mithilfe der Aminoacyl-tRNA-Synthetase

mit dem photoreaktiven Aminosäureanalogon p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBpa) beladen. Das eingefügte Stop-Codon wird von dieser tRNA erkannt und anstelle eines Translationsabbruchs wird der *Crosslinker* pBpa an dieser Stelle der Aminosäuresequenz von Der1 eingebaut. Anschließend werden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt, was zu Quervernetzungen (*Crosslinks*) mit Proteinen führt, die sich in räumlicher Nähe zur markierten Position befinden. Nach der Zellyse wird Der1 mithilfe eines 13xMyc-Epitops unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert. Die Detektion der quervernetzten Interaktionspartner erfolgt durch einen Immunoblot. pBpa bildet Quervernetzungen zu Kohlenwasserstoffbindungen von Polypeptidketten aus, die sich in einem Radius von 3-4 Å zur reaktiven Ketongruppe des pBpa befinden [105]. Aufgrund dieser Spezifität ist es möglich, neben der Identifizierung von Substratbindungsstellen auch genaue Aussagen über die Topologie von Der1 in der HRD-Ligase zu treffen.

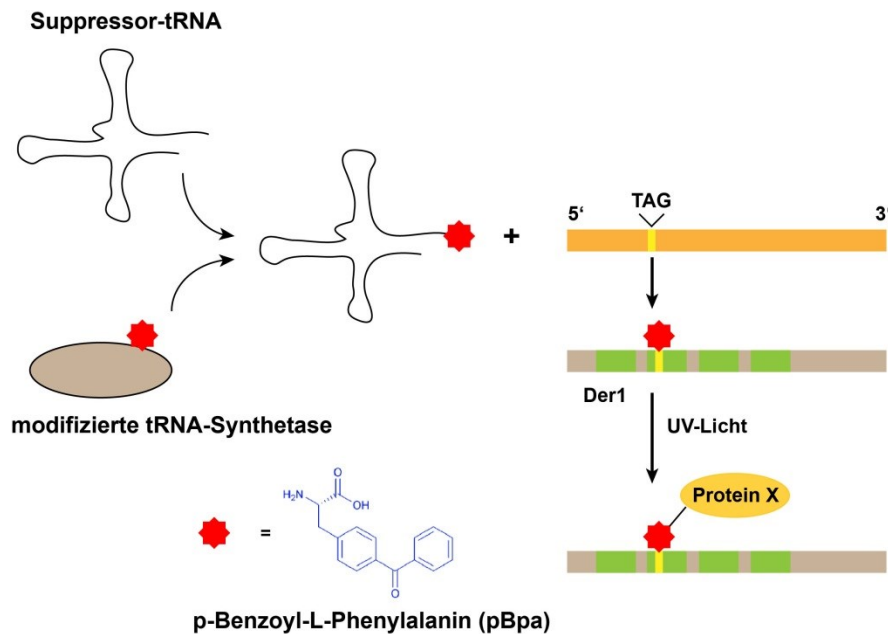


Abb. 3.32: Experimenteller Ablauf des zielgerichteten *in vivo* photocrosslinking von Der1. Zunächst wird das Codon einer Aminosäure von Der1 zu einem Stop-Codon mutiert. Dieses wird durch eine spezielle tRNA erkannt, die mit dem photoreaktiven Aminosäureanalogon p-Benzoyl-L-Phenylalanin (pBpa) beladen ist. Auf diese Weise wird der *Crosslinker* pBpa an einer bestimmten Position in der Aminosäuresequenz von Der1 eingebaut. Die Hefezellen, die das pBpa-markierte Der1-Konstrukt exprimieren, werden anschließend mit UV-Licht bestrahlt, wodurch es zu Quervernetzungen mit Proteinen kommt, die sich in räumlicher Nähe zur photoreaktiven Position in Der1 befinden. Nach einer Zellyse wird Der1 unter denaturierenden Bedingungen mithilfe eines 13xMyc-Epitops aus dem Zellextrakt isoliert und im Immunoblot auf Quervernetzungen zu verschiedenen Komponenten des ERAD-Systems überprüft. Modifiziert nach [73].

Die Methode des zielgerichteten *in vivo* photocrosslinking wurde vor allem auf die TM-Domänen von Der1 angewendet. Da Mutationen in der ersten und zweiten TM-Domäne die Funktion von Der1 beim Abbau fehlgefalteter Substrate beeinträchtigen, wurden

mehrere Aminosäuren in diesen TM-Domänen durch pBpa ersetzt und auf eine Quervernetzung mit dem Substrat CPY* getestet (Abb. 3.33). Des Weiteren wurden Positionen in der ersten luminalen Schleife, die die erste und die zweite TM-Domäne miteinander verbindet und einige konservierte Aminosäuren enthält, mit pBpa markiert. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich von Der1 an der Interaktion zu Usa1 beteiligt ist (Abschn. 3.2.2). Daher sollte schließlich auch die vierte TM-Domäne insbesondere mit Hinblick auf eine räumliche Nähe zu Usa1 durch diese Methode charakterisiert werden.

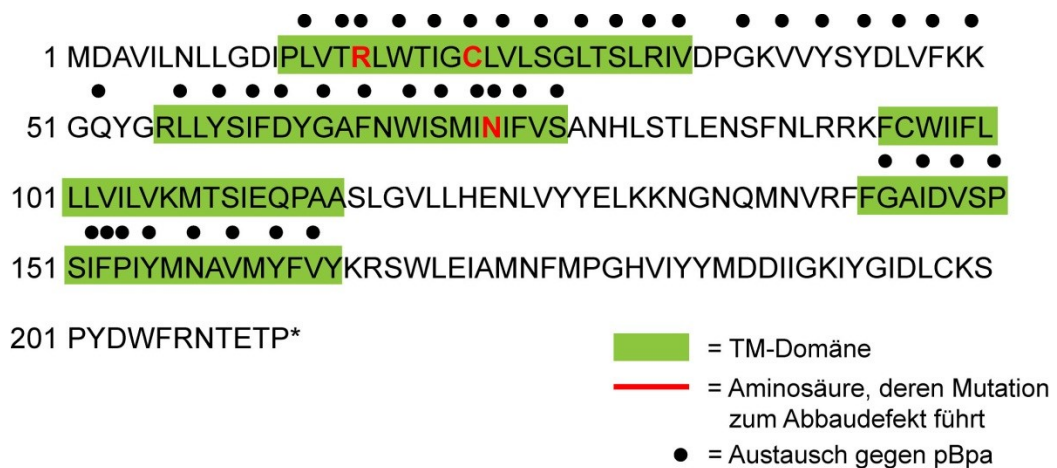


Abb. 3.33: Position der Aminosäuren in Der1, die durch den Crosslinker pBpa ersetzt wurden. Um mögliche Quervernetzungen von Der1 zum Substrat CPY* und zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase zu untersuchen, wurden vor allem Positionen in der ersten, zweiten und vierten TM-Domäne mit pBpa markiert. Des Weiteren wurden einige Aminosäuren der ersten luminalen Schleife durch pBpa ersetzt.

3.6.2 Stabilität, Funktionalität und Assoziation der pBpa-markierten Der1-Varianten mit der HRD-Ligase

Zunächst sollte mithilfe eines Cycloheximid-Experiments der Einfluss des eingebauten pBpa auf die Stabilität und Funktionalität von Der1 untersucht werden. Stellvertretend für alle weiteren pBpa-markierten Der1-Varianten wurde Der1 (L14-pBpa)-13xMyc für diesen Versuch eingesetzt, bei der anstelle eines Leucins an der Position 14 der Crosslinker pBpa eingebaut wurde. Um die Menge an photoreaktivem Der1 in der Zelle zu erhöhen, wurden die pBpa-modifizierten Der1-Varianten in allen folgenden Experimenten überexprimiert.

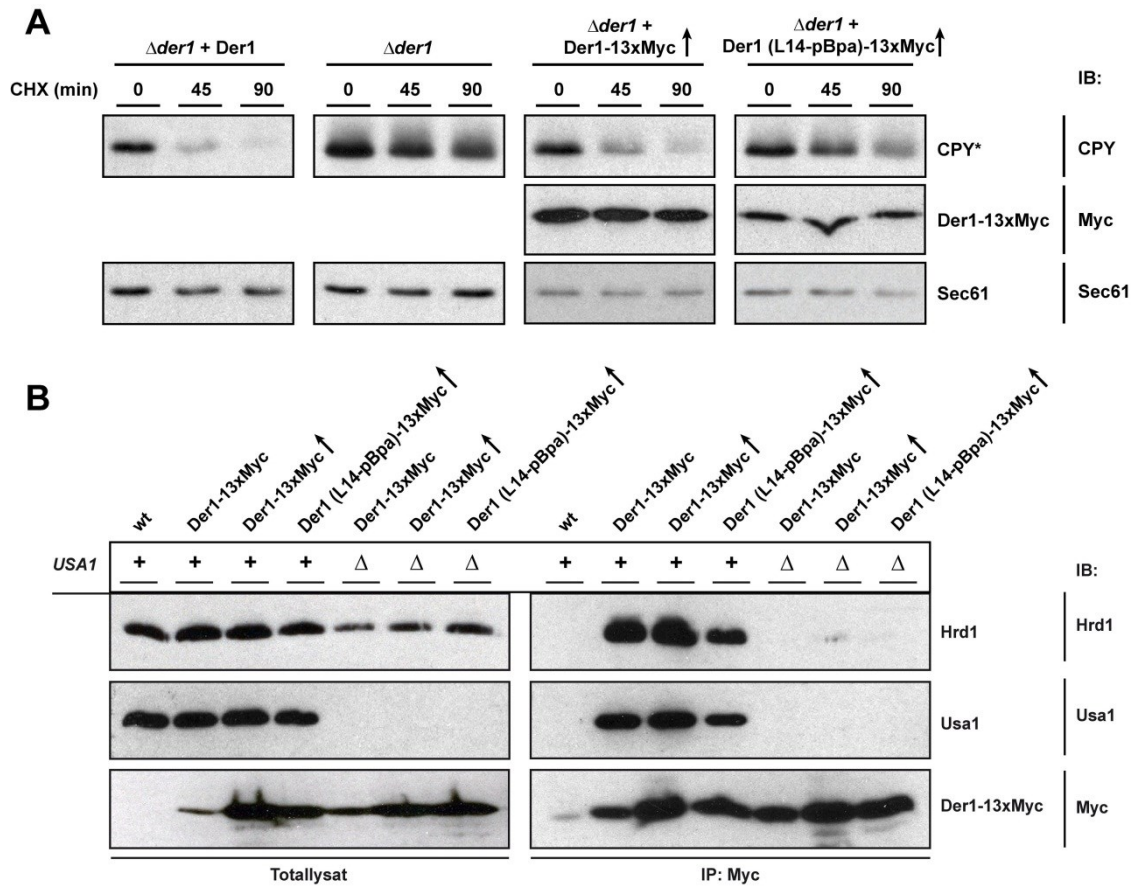


Abb. 3.34: Das eingebaute pBpa beeinflusst weder die Stabilität noch die Integration von Der1-13xMyc in die HRD-Ligase. Cycloheximid-Experiment zur Ermittlung der Stabilität und Funktionalität von pBpa-markiertem Der1 (A). Plasmid-codiertes Der1-13xMyc wurde an der Position L14 mit pBpa markiert (Der1 (L14-pBpa)-13xMyc) und in $\Delta der1$ -Zellen transformiert. Sowohl Der1-13xMyc als auch Der1 (L14-pBpa)-13xMyc waren auf einem *multiple copy*-Plasmid codiert (\uparrow). Eine zusätzliche Überexpression wurde 3 h vor Beginn des Cycloheximid-Experiments durch eine Aktivierung des *CUP*-Promotors induziert. Ko-IP zur Analyse der Interaktion von Der1 (L14-pBpa)-13xMyc mit Komponenten der HRD-Ligase (B). Sowohl die pBpa-markierte Der1-Variante als auch Der1-13xMyc wurden wie in (A) überexprimiert und anschließend mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper unter nicht denaturierenden Bedingungen präzipitiert.

Wie in Abb. 3.34 (A) zu sehen ist, beeinflusste die Modifizierung von Der1-13xMyc mit pBpa nicht die Stabilität des Proteins. Allerdings scheint die pBpa-markierte Variante schwächer exprimiert zu werden als unmodifiziertes Der1-13xMyc. Die Funktionalität von Der1 (L14-pBpa)-13xMyc wurde anhand des Abbaus von CPY* getestet. Im Gegensatz zur Expression unter endogenem Promotor konnte die Überexpression von Der1-13xMyc den CPY*-Abbaudefekt der *DER1*-Deletion nahezu vollständig komplementieren, was mit Berichten aus der Literatur übereinstimmt [73]. Die Überexpression der pBpa-markierten Der1-Variante hingegen zeigte eine Stabilisierung von CPY*, wobei im Vergleich zur *DER1*-Deletionsmutante noch ein schwacher Abbau zu erkennen war. Somit könnte die geringe Expression von Der1 (L14-pBpa)-13xMyc ein Grund für die Verzögerung des CPY*-Abbaus sein. Zudem wurde durch eine Ko-IP mit Der1 (L14-pBpa)-13xMyc gezeigt, dass der Einbau des pBpa in die Polypeptidkette von Der1 keinen Einfluss auf die

Integration in die HRD-Ligase hat (Abb. 3.34 (B)). So wurde weder die Interaktion zu Usa1 noch zu Hrd1 durch die Modifizierung beeinträchtigt. Die Bindung zu Hrd1 war wie im Fall von unmodifiziertem Der1-13xMyc von Usa1 abhängig.

3.6.3 Der1 bildet Quervernetzungen zum ERAD-Substrat CPY* und zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase aus

Der1 wurde insgesamt an 44 Positionen mit dem *Crosslinker* pBpa modifiziert. Die pBpa-modifizierten Der1-Varianten waren Plasmid-codiert und wurden über einen induzierbaren *CUP*-Promotor überexprimiert. Als Stammhintergrund für die Durchführung der *Crosslinking*-Experimente wurde eine $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Mutante gewählt. Durch die Expression einer katalytisch inaktiven Ubc7-Mutante sollte zum einen der Abbau und damit die Dislokation von Substraten aus dem ER verlangsamt werden, um Quervernetzungen auch zu luminalen ERAD-Substraten zu ermöglichen, die nur schwach oder transient mit Der1 wechselwirken. Zum anderen führte die Blockierung des Abbaus zu einer Angleichung der Substratmenge in den Hefestämmen, die mit den unterschiedlichen pBpa-markierten Der1-Varianten transformiert wurden. Um deutlich zu machen, dass die Detektion von Interaktionspartnern im Präzipitat von pBpa-modifiziertem Der1-13xMyc tatsächlich auf eine Quervernetzung zurückzuführen ist, wurden die Experimente sowohl mit als auch ohne UV-Bestrahlung durchgeführt. Außerdem wurde zum Nachweis, dass die Quervernetzung zu einem Interaktionspartner auf eine spezifische Reaktion des eingebauten *Crosslinkers* pBpa basiert, unmodifiziertes Der1-13xMyc für das *Crosslinking*-Experiment verwendet.

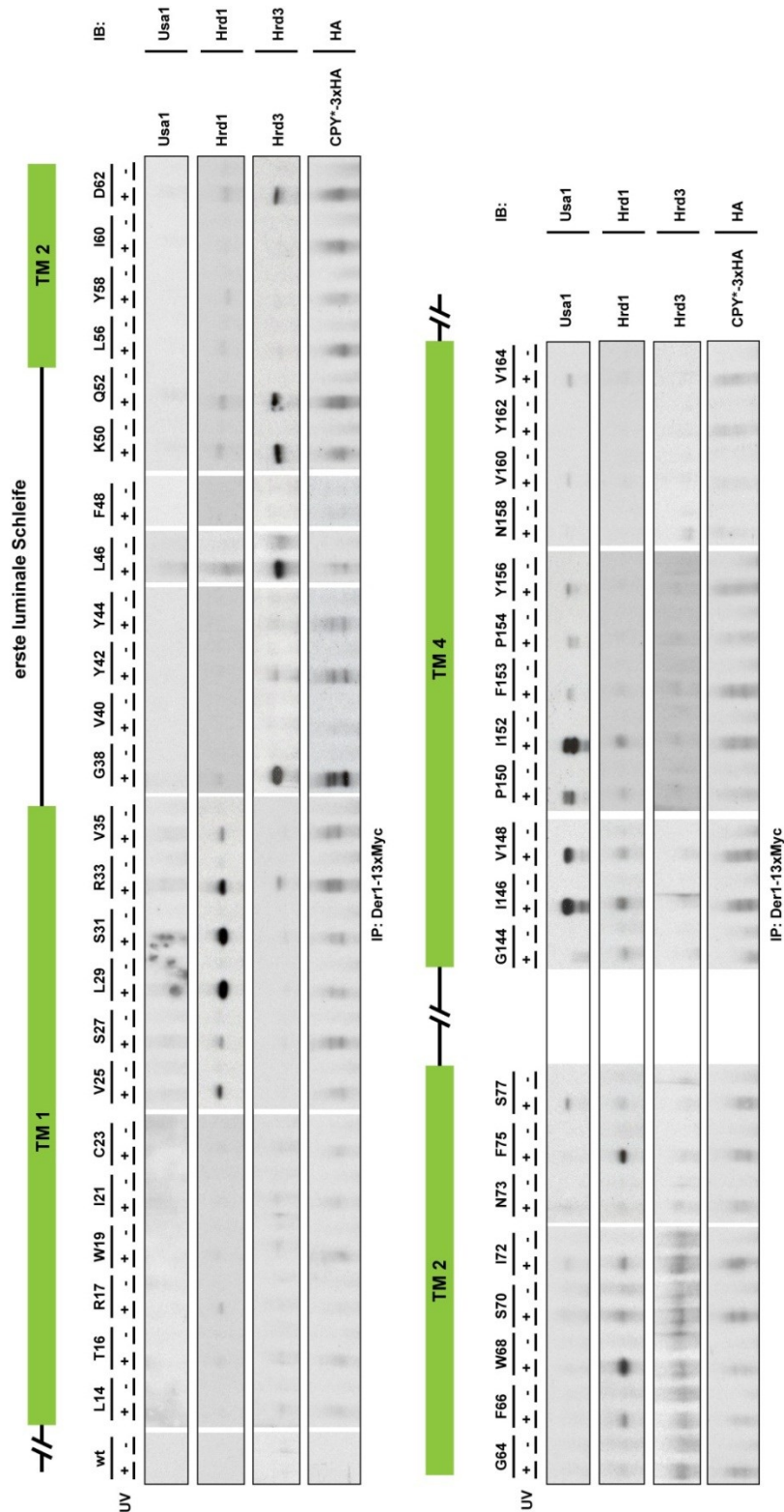


Abb. 3.35: Der1-13xMyc bildet an verschiedenen Positionen Crosslinking-Reaktionen zu Komponenten der HRD-Ligase und zum Substrat CPY* aus. $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen wurden mit Der1-13xMyc-Konstrukten transformiert, die an jeweils einer Position mit dem Crosslinker pBpa modifiziert waren. Zur Überprüfung der Spezifität der Crosslinking-Reaktionen wurde das Experiment auch mit unmarkiertem Der1-13xMyc (wt) durchgeführt. Nach einer UV-Bestrahlung der Zellen für 45 min bei 4 °C und anschließender Zelllyse wurden die pBpa-markierten Der1-13xMyc-Varianten mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert. Die Detektion der quervernetzten Interaktionspartner erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot.

In Abb. 3.35 sind die Quervernetzungen der verschiedenen Positionen in Der1 zu den Komponenten der HRD-Ligase dargestellt. Der C-terminale Bereich der ersten TM-Domäne zeigte an mehreren Positionen deutliche *Crosslinking*-Reaktionen zu Hrd1. Hierbei waren zunächst eine zunehmende und dann wieder eine abnehmende *Crosslinking*-Intensität über mehrere Aminosäuren erkennbar. An den Positionen L29 und S31 war die Quervernetzung zu Hrd1 am stärksten, so dass an dieser Stelle von einer großen räumlichen Nähe zu Hrd1 ausgegangen werden kann. Weitere jedoch meist schwächere Hrd1-*Crosslinks* waren auch an einigen Positionen in der zweiten TM-Domäne zu beobachten. In der ersten luminalen Schleife und in der vierten TM-Domäne fand dagegen keine *Crosslinking*-Reaktion zu Hrd1 statt. Zum direkten Interaktionspartner Usa1 konnten signifikante Quervernetzungen nur in der vierten TM-Domäne beobachtet werden. Diese konzentrierten sich im N-terminalen Bereich der TM-Domäne. Obwohl der Substratrezeptor Hrd3 nur indirekt über Usa1 und Hrd1 mit Der1 wechselwirkt, wurden auch hier starke *Crosslinking*-Signale an mehreren Positionen von Der1 detektiert. Die Quervernetzungen zu Hrd3 fanden fast ausschließlich in der ersten luminalen Schleife statt, wobei schwache Hrd3-Signale auch auf der luminal ausgerichteten Seite der ersten und zweiten TM-Domäne zu erkennen waren. Während sich die *Crosslinks* zu den HRD-Ligase-Komponenten auf bestimmte Aminosäurereste konzentrierten, ergab sich für das luminal ERAD-Substrat CPY*-3xHA eine breite Verteilung der *Crosslinking*-Positionen. Außerdem waren im Gegensatz zu den Quervernetzungen der HRD-Ligase-Komponenten die *Crosslinking*-Signale zum Substrat wesentlich schwächer und diffuser. So konnten nicht eine distinkte Bande sondern mehrere Signale mit zum Teil auch unterschiedlicher Intensität detektiert werden. Während im N-terminalen Bereich der ersten TM-Domäne keine CPY*-3xHA-Quervernetzungen beobachtet wurden, konnten in der luminalen Schleife sowie auf der zum Lumen ausgerichteten Seite der zweiten und vierten TM-Domäne *Crosslinking*-Signale festgestellt werden. Die Intensität der Quervernetzungen zu CPY*-3xHA waren an den verschiedenen Positionen von Der1 unterschiedlich. Auffallend war vor allem die Quervernetzung zum Glycin 38 der luminalen Schleife. An dieser Position war das *Crosslinking*-Signal zu CPY*-3xHA am stärksten. Im Übrigen unterschied sich an diesem Aminosäurerest das Bandenmuster des quervernetzten Substrats zu den *Crosslinking*-Reaktionen an anderen Positionen. Bemerkenswerterweise konnte am Glycin 38 auch ein starkes Signal für den Substratrezeptor Hrd3 gefunden werden. Sowohl bei einer Durchführung der *Crosslinking*-Experimente ohne UV-Bestrahlung als auch bei einer Expression des unmodifizierten Der1-13xMyc war eine Quervernetzung mit CPY*-3xHA oder den Untereinheiten der HRD-Ligase nicht möglich, was schließlich die Spezifität der *Crosslinks* an den verschiedenen Positionen verdeutlicht. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl in den TM-Domänen als auch im

luminalen Bereich an distinkten Positionen eine räumliche Nähe zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden Quervernetzungen zum Substrat CPY*-3xHA in einigen Teilen der TM-Domänen, vor allem aber in der ersten luminalen Schleife von Der1, beobachtet.

3.6.4 Die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase über Usa1 ist für die Ausbildung der *Crosslinking*-Reaktionen zu Hrd1 und Hrd3 notwendig

Um zu zeigen, dass die Quervernetzungen zu Hrd1 und Hrd3 auf eine intakte Integration von pBpa-modifiziertem Der1-13xMyc in die HRD-Ligase beruhen, wurden die *Crosslinking*-Experimente für bestimmte Positionen in einer *USA1*-Deletionsmutante wiederholt. Usa1 vermittelt die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase, so dass in $\Delta usa1$ -Zellen eine Interaktion bzw. eine Quervernetzung zu Hrd1 und Hrd3 nicht mehr möglich sein sollte. Für den Versuch wurden Positionen von Der1 ausgewählt, die eine markante Quervernetzung zu Hrd1 oder Hrd3 aufweisen.

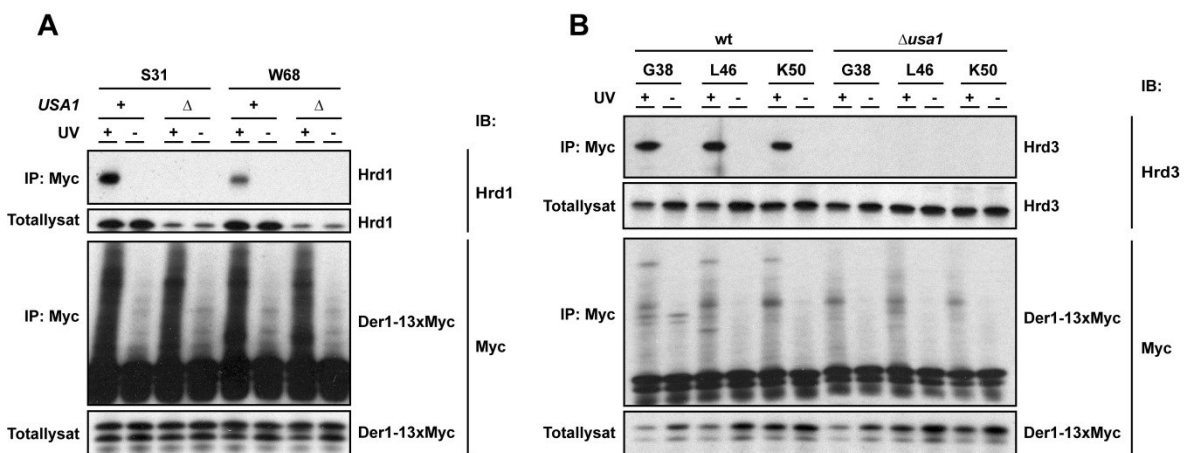


Abb. 3.36: Die Crosslinks zu Hrd1 und Hrd3 sind von Usa1 abhängig. *Crosslinking*-Experimente zum Einfluss von Usa1 auf die Hrd1- und Hrd3-Quervernetzungen (A) und (B). Die pBpa-markierten Der1-13xMyc-Varianten wurden in $\Delta der1$ Ubc7 (C89S)- bzw. in $\Delta der1 \Delta usa1$ Ubc7 (C89S)-Zellen überexprimiert und mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper nach Durchführung des *photocrosslinking* präzipitiert.

Wie aus Abb. 3.36 (A) ersichtlich wird, verhinderte die Deletion von *USA1* die Ausbildung von Hrd1-Crosslinks an der Position S31 in der ersten sowie an der Position W68 in der zweiten TM-Domäne. Allerdings fällt bei Betrachtung des Totallysats auf, dass die Proteinmengen von Hrd1 im $\Delta usa1$ -Stammhintergrund deutlich reduziert waren. Da die Menge an präzipitiertem Der1-13xMyc sowohl im Totallysat als auch im Präzipitat der IP gleich war, sind die unterschiedlichen Hrd1-Mengen eher auf stammspezifische Ursachen als auf experimentelle Probleme zurückzuführen. Für Der1-13xMyc konnte vor allem im Präzipitat nach UV-Bestrahlung eine Schwärzung des Immunoblots bis in den

hochmolekularen Bereich beobachtet werden, der aus Quervernetzungen zu verschiedenen zellulären Proteinen resultiert und auf diese Weise die Reaktivität des pBpa-markierten Der1-13xMyc belegt. Des Weiteren wiesen die überexprimierten Der1-13xMyc-Varianten zwei markante Signale im Immunoblot auf, während bei einer Expression unter endogenem Promotor nur ein Signal für Der1-13xMyc zu erkennen war (Abb. 3.11 (A)). Somit scheint die Überexpression eine proteolytische Prozessierung des 13xMyc-Epitops zu bewirken. Den Hrd1-*Crosslinks* entsprechend war auch eine Quervernetzung zu Hrd3 an verschiedenen Positionen der ersten luminalen Schleife (G38, L46 und K50) in Abwesenheit von Usa1 nicht mehr möglich (Abb. 3.36 (B)). Dies macht deutlich, dass pBpa-modifiziertes Der1-13xMyc wie wt-Der1 über Usa1 an die HRD-Ligase rekrutiert wird und daher Quervernetzungen zu Hrd1 und Hrd3 nur in Anwesenheit von Usa1 ausgebildet werden können. Außerdem stimmen diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus Abschn. 3.6.2 überein, wonach die Modifizierung von Der1-13xMyc mit pBpa keinen Einfluss auf die Integration von Der1 in die HRD-Ligase hat.

3.6.5 Die erste luminal Schleife von Der1 bildet Quervernetzungen zur luminalen Domäne von Hrd3 aus

Im Folgenden sollte bestätigt werden, dass die Quervernetzung zwischen Der1 und Hrd3 auf der luminalen Seite der ER-Membran stattfindet. Hierzu wurde eine verkürzte Hrd3-Mutante exprimiert, die nur aus dem luminalen N-Terminus besteht (Hrd3 lum) (Abb. 3.37 (A)). Die luminal Hrd3-Domäne bindet an Hrd1 und ist dadurch weiterhin aktiv im Abbau von ERAD-Substraten [35]. Für das *Crosslinking*-Experiment wurden Der1-Varianten verwendet, die zuvor eine deutliche Hrd3-Quervernetzung gezeigt hatten.

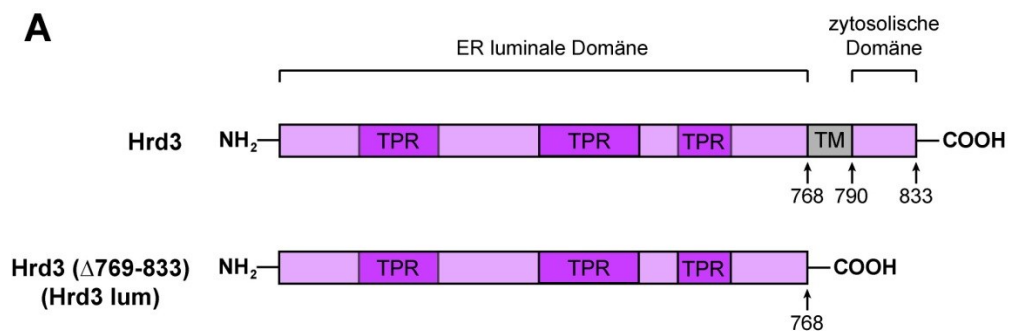


Abb. 3.37 (A): Positionen der ersten luminalen Schleife von Der1-13xMyc bilden *Crosslinks* zur luminalen Domäne von Hrd3 aus. Schematische Darstellung der C-terminal verkürzten Hrd3-Mutante. Zur Charakterisierung der *Crosslinking*-Reaktion zu Hrd3 wurde eine Hrd3-Mutante exprimiert, die nur aus der löslichen luminalen Domäne (1-768) des Proteins besteht. TPR = *Tetratricopeptide repeat*

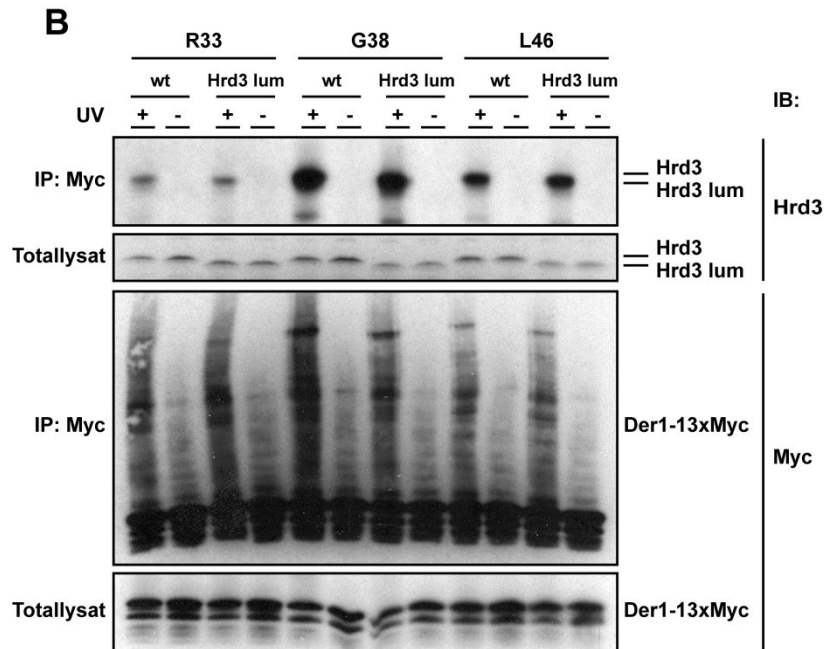


Abb. 3.37 (B): Positionen der ersten luminalen Schleife von Der1-13xMyc bilden *Crosslinks* zur luminalen Domäne von Hrd3 aus. Die *Crosslinking*-Experimente fanden in $\Delta der1$ - und $\Delta der1$ Hrd3 ($\Delta 769-833$)-Zellen statt, die mit verschiedenen pBpa-markierten Der1-13xMyc-Konstrukten transformiert wurden. Voll-länge-Hrd3 und die trunkierte Hrd3-Mutante wurden im Immunoblot mit einem spezifischen α -Hrd3-Antikörper detektiert, der gegen ein Epitop im Hrd3 C-Terminus gerichtet ist.

Die trunkierte Hrd3-Mutante war weiterhin in der Lage, mit der luminalen Schleife von Der1 (G38 und L46) *Crosslinking*-Reaktionen auszubilden (Abb. 3.37 (B)). Auch die Intensität der Quervernetzung wurde nicht durch die Verkürzung von Hrd3 beeinflusst. Obwohl sich die Aminosäurerest R33 nach Topologie-Vorhersagen am C-terminalen Ende der ersten TM-Domäne befinden sollte, konnte auch hier eine Quervernetzung zur luminalen Hrd3-Domäne gefunden werden. Da allerdings die Lage der TM-Domänen vorwiegend nur mittels Hydropathie-Diagramm ermittelt wurde, besteht auch die Möglichkeit, dass der Bereich um den Aminosäurerest R33 bereits im ER-Lumen liegt. Dennoch konnte anhand dieser Experimente verdeutlicht werden, dass sich die luminal Domäne von Hrd3 in enger räumlicher Nähe zur luminalen Schleife von Der1 befindet und daher Quervernetzungen zwischen diesen Bereichen ausgebildet werden können.

3.6.6 Der1 bildet unabhängig von der Rekrutierung zur HRD-Ligase

Quervernetzungen zum Substrat CPY* aus

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass pBpa-modifiziertes Der1-13xMyc Quervernetzungen mit dem Substrat CPY*-3xHA sowohl in den TM-Domänen als auch im luminalen Bereich ausbildet. Außerdem überschneiden sich an einigen Positionen die CPY*-3xHA- und Hrd3-*Crosslinks*. Daher sollte nun überprüft werden, ob

die Quervernetzungen zu CPY*-3xHA durch Hrd3 vermittelt werden. Die folgenden Experimente wurden deshalb in einer *HRD3*-Deletionsmutante durchgeführt. Da die Deletion von *HRD3* eine Blockierung des Substratabbaus hervorruft und es dadurch zu einer Anreicherung von CPY* im ER kommt, wäre eine Evaluierung der quervernetzten CPY*-Menge sehr schwierig. Durch die Verwendung einer katalytisch inaktiven Ubc7 (C89S)-Mutante als Stammhintergrund wird die CPY*-Menge in den verschiedenen Stämmen angeglichen, so dass eine Beurteilung der CPY*-Quervernetzung zu Der1 in Abhängigkeit von Hrd3 möglich ist. Für das *Crosslinking*-Experiment wurden Positionen in Der1 analysiert, die eine signifikante CPY*-3xHA-Quervernetzung aufweisen und sich in der luminalen Schleife oder in den TM-Domänen befinden.

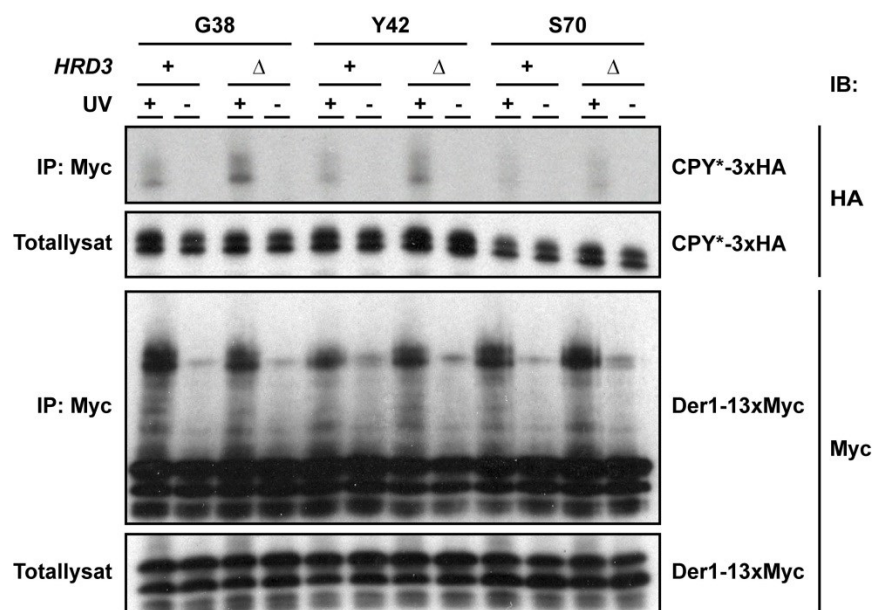


Abb. 3.38: Die Quervernetzungen von Der1-13xMyc zu CPY*-3xHA sind unabhängig von Hrd3. Die pBpa-markierten Der1-Varianten wurden in $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen exprimiert. Zur Analyse des Einflusses von Hrd3 auf die CPY*-3xHA-Quervernetzungen wurde *HRD3* in diesen Zellen deletiert und die *Crosslinking*-Reaktionen zu CPY*-3xHA mit einem polyklonalen α -HA-Antikörper im Immunoblot detektiert.

Die *HRD3*-Deletion hatte sowohl im luminalen Bereich (G38 und Y42) als auch in der TM-Domäne (S70) keine reduzierende Wirkung auf die Intensität der Quervernetzungen zu CPY*-3xHA (Abb. 3.38). Auch an der Position G38, die zu CPY*-3xHA und Hrd3 starke *Crosslinking*-Reaktionen ausbildet, war keine Reduktion des Substrat-*Crosslinking* zu erkennen. Stattdessen schien die *Crosslinking*-Intensität zu CPY*-3xHA vor allem im luminalen Bereich etwas erhöht zu sein. Außerdem konnten für CPY*-3xHA im Totallysat zwei dicht übereinander liegende Signale beobachtet werden. Bei einer Blockierung des Abbaus kommt es zu einem reversiblen Transport von CPY* in den Golgi, was zu einer weiteren Glykosylierung des Proteins und damit zu einer Aufspaltung des CPY*-3xHA-Signals im Immunoblot führt [106,107].

Um festzustellen, ob die Quervernetzung zum Substrat von der Integration des Der1 in die HRD-Ligase abhängig ist, wurden die *Crosslinking*-Reaktionen in einer *USA1*-Deletionsmutante wiederholt. Zum Ausgleich der CPY*-3xHA-Mengen wurde das Experiment in einem Ubc7 (C89S)-Stammhintergrund durchgeführt.

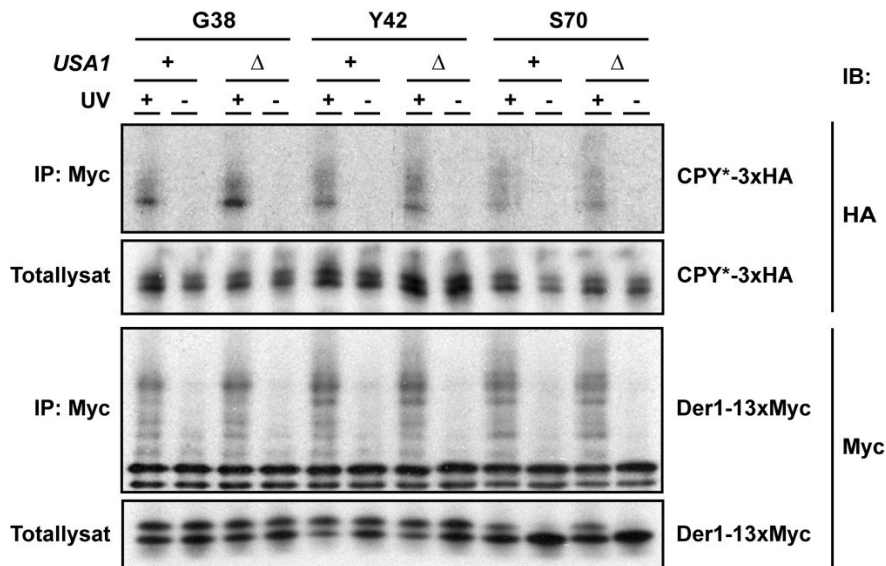


Abb. 3.39: Der1-13xMyc bildet unabhängig von Usa1 Crosslinks mit CPY*-3xHA aus. Die pBpa-markierten Der1-Varianten wurden in $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen exprimiert. Zur Analyse des Einflusses von Usa1 auf die CPY*-3xHA-Quervernetzungen wurde *USA1* in diesen Zellen deletiert und die *Crosslinking*-Reaktionen zu CPY*-3xHA mit einem polyklonalen α -HA-Antikörper im Immunoblot detektiert.

Obwohl eine *USA1*-Deletion die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase verhindert, wurde das Substrat-*Crosslinking* nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 3.39). Allerdings konnte an der Position G38 wieder ein leicht verstärktes *Crosslinking*-Signal für CPY*-3xHA beobachtet werden.

Die folgenden Ko-IP-Experimente bestätigten schließlich die Unabhängigkeit der Der1-Substratwechselwirkung von der Integration in die HRD-Ligase. Hierbei wurden 13xMyc-markiertes Der1 bzw. C-terminal verkürzte Der1-13xMyc-Varianten präzipitiert und die Wechselwirkung mit CPY* in Abhängigkeit von Usa1 untersucht.

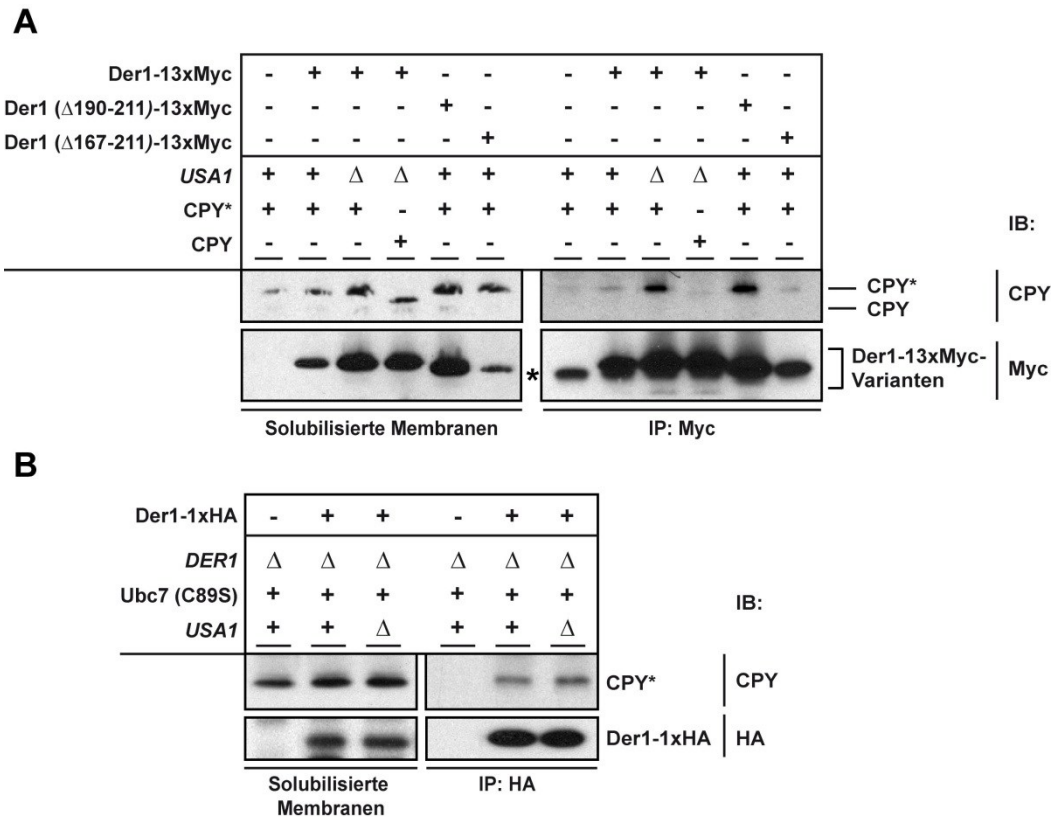


Abb. 3.40: Der1-13xMyc wechselwirkt unabhängig von Usa1 mit CPY*. Ko-IP zum Einfluss von Usa1 und des Der1 C-Terminus auf die Interaktion mit CPY* (A). Mikrosomen wurden durch eine differentielle Zentrifugation aus dem Zelllysat präpariert und mit NP-40-Puffer solubilisiert. Endogen exprimiertes Der1-13xMyc bzw. C-terminal verkürzte Der1-13xMyc-Varianten (Der1 (Δ190-211) und Der1 (Δ167-211)) wurden anschließend mittels monoklonaler α-Myc-Antikörper präzipitiert. Um die Spezifität der Wechselwirkung von Der1-13xMyc mit fehlgefalteten Substraten deutlich zu machen, wurde auch die Interaktion zu nativem CPY getestet. * = Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem zur IP verwendeten Antikörper. Ko-IP mit Der1-1xHA anstelle von Der1-13xMyc zur Verifizierung des Einflusses von Usa1 auf die Substratwechselwirkung (B). Da Der1-1xHA in Abwesenheit von Usa1 instabil wird (Abschn. 3.3.2), wurde das Experiment im Ubc7 (C89S)-Stammhintergrund durchgeführt. Das Plasmid-codierte Der1-1xHA wurde nach der Solubilisierung der Mikrosomen in NP40-Puffer mit monoklonalen α-HA-Antikörpern präzipitiert.

Die Deletion von *USA1* störte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Crosslinking*-Experimente nicht die Assoziation von Der1 mit CPY* (Abb. 3.40 (A)). Stattdessen war eine deutliche Zunahme der Substratwechselwirkung zu erkennen. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Proteinmenge sowohl von Der1-13xMyc als auch von CPY* in den Δ*usa1*-Zellen erhöht war. Im Gegensatz zu CPY* konnte eine Interaktion von Der1 mit dem nativ gefalteten CPY nicht festgestellt werden, was die Spezifität der Wechselwirkung von Der1 zu fehlgefalteten Proteinen belegt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung des zytosolischen Der1 C-Terminus (Der1 (Δ190-211)-13xMyc) die Interaktion zu CPY* nicht beeinflusst. Die Deletion des gesamten C-Terminus (Der1 (Δ167-211)-13xMyc) hatte eine starke Reduzierung der Proteinmenge von Der1 zur Folge, so dass dementsprechend auch wesentlich weniger CPY* ko-präzipitiert wurde. Dennoch fand auch unter diesen Bedingungen noch eine Wechselwirkung zwischen Der1

und CPY* statt. Daraus folgt, dass die Interaktion mit dem Substrat vermutlich über die luminalen Bereiche von Der1 erfolgt. Da das 13xMyc-Epitop Der1 funktionell beeinträchtigt (Abschn. 3.3.2), wurde der Einfluss von Usa1 auf die Substratwechselwirkung nochmals mit einer funktionellen 1xHA-markierten Der1-Variante untersucht. Wie in Abb. 3.40 (B) zu sehen ist, war auch Der1-1xHA in der Lage, unabhängig von Usa1 und der Rekrutierung zur HRD-Ligase mit CPY* zu interagieren.

3.6.7 Mutationen in den TM-Domänen von Der1 beeinflussen die *Cross-linking*-Reaktionen zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase

Mutationen in den TM-Domänen von Der1 stören den Export und dadurch den Abbau luminaler ERAD-Substrate (Abschn. 3.5.2). Die Stabilität und die Integration von Der1 in die HRD-Ligase werden hingegen nicht durch die Mutationen beeinflusst (Abschn. 3.5.3). Es blieb daher weiterhin unklar, wie der Abbauprozess auf mechanistischer Ebene durch die TM-Mutanten beeinträchtigt wird. Da mithilfe der Methode des zielgerichteten *in vivo photocrosslinking* selbst kleine, lokal begrenzte strukturelle Veränderungen innerhalb eines Proteinkomplexes detektiert werden können, wurde der Einfluss der TM-Mutationen auf die *Crosslinking*-Reaktionen von Der1 zum Substrat CPY* und zu einigen Komponenten der HRD-Ligase getestet. Für die *Crosslinking*-Experimente wurde alternativ zu wt-Der1 die Der1 (R17LN73L)-Mutante verwendet, die in den vorangegangenen Experimenten den stärksten Effekt auf den Substratabbau zeigte (Abschn. 3.5.2). Da die TM-Mutante eine Anreicherung von CPY* im ER-Lumen verursacht, wurde das *Crosslinking* in einem $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Stammhintergrund durchgeführt. Die Expression der katalytisch inaktiven Ubc7-Mutante ermöglicht so wieder eine Angleichung der Substratmengen in den verschiedenen Stämmen. Um den Effekt der Mutationen auf die strukturelle Ausrichtung von Der1 zu den Untereinheiten der HRD-Ligase zu untersuchen, wurden bestimmte Positionen ausgewählt, die bereits in den Vorversuchen markante *Crosslinks* zu Hrd1 (S31), Hrd3 (G38) oder Usa1 (I146) ausbildeten (Abschn. 3.6.3).

Die Quervernetzung zu Usa1 in der vierten TM-Domäne und zu Hrd1 in der ersten TM-Domäne war bei einer Expression der Der1 TM-Mutante deutlich reduziert (Abb. 3.41). Im Gegensatz dazu war das Hrd3-*Crosslinking* am Aminosäurerest G38 in der ersten luminalen Schleife wesentlich geringer beeinträchtigt. Während durch die Mutationen in den TM-Domänen die *Crosslinking*-Reaktionen zu den HRD-Ligase-Komponenten abgeschwächt wurden, konnte in der luminalen Schleife deutlich mehr Substrat mit der TM-Mutante quervernetzt werden.

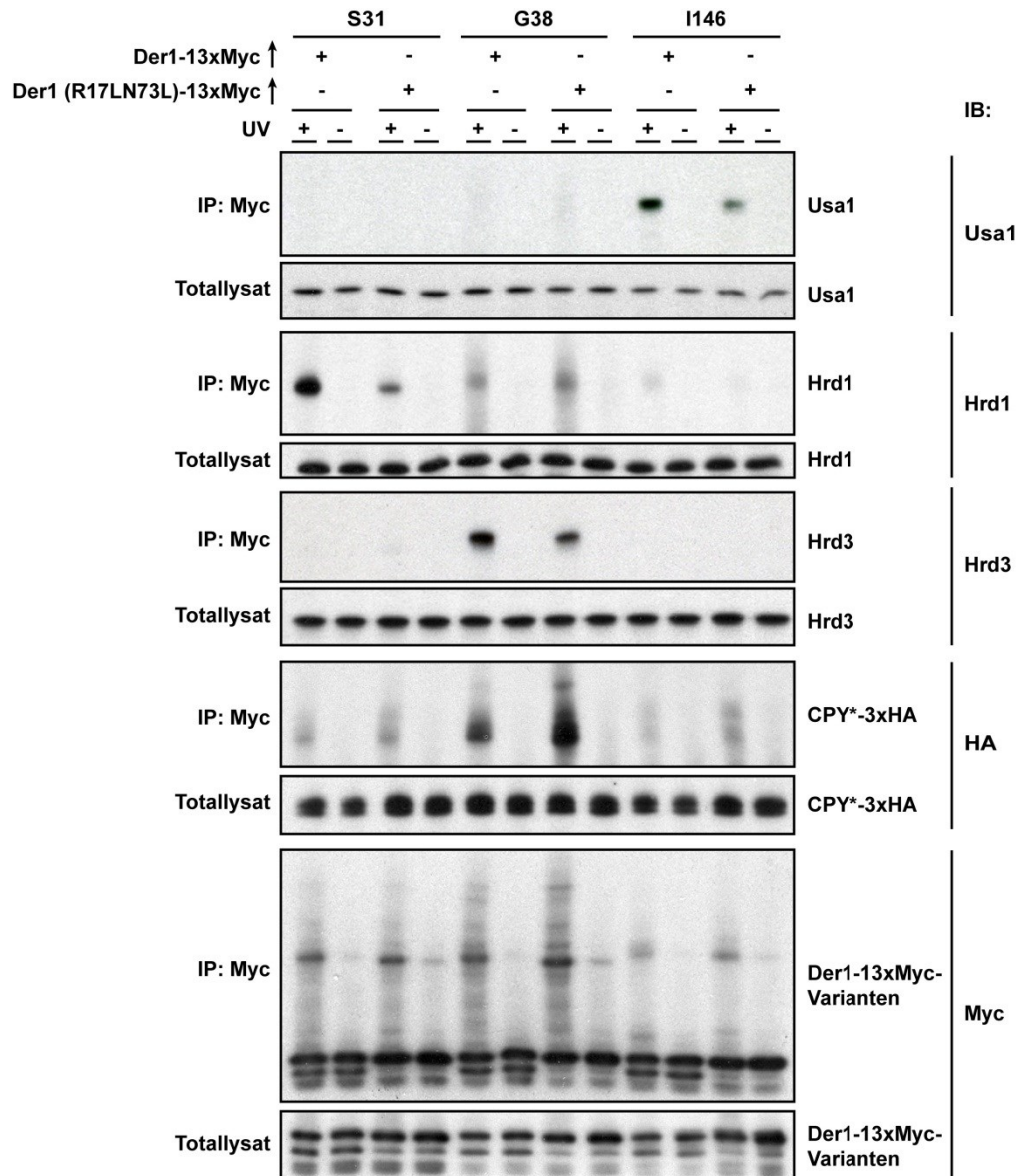


Abb. 3.41: Mutationen in den Der1 TM-Domänen beeinflussen die *Crosslinking*-Reaktionen zu den Komponenten der HRD-Ligase und zu CPY*-3xHA. $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen wurden mit Der1-13xMyc oder Der1 (R17LN73L)-13xMyc transformiert und anschließend *Crosslinking*-Experimente durchgeführt. Sowohl wt-Der1 als auch die TM-Mutante wurden an bestimmten Positionen mit pBpa markiert, die bereits in den Vorversuchen Quervernetzungen zu Hrd1 (S31), Hrd3 und CPY*-3xHA (G38) sowie zu Usa1 (I146) zeigten. Die Der1-Konstrukte wurden überexprimiert (\uparrow).

Um auszuschließen, dass die Reduktion der *Crosslinking*-Intensitäten auf eine gestörte Assoziation der pBpa-modifizierten Der1 TM-Mutante mit den Komponenten der HRD-Ligase beruht, wurde anschließend eine Ko-IP durchgeführt.

Die Mutationen in den TM-Domänen hatten keinen Einfluss auf die Interaktion der pBpa-modifizierten Der1 TM-Mutanten mit Usa1, Hrd1 und Hrd3 (Abb. 3.42 (A, B)). Dies korreliert mit Bindungsstudien, die mit unmodifizierten Der1 TM-Mutanten durchgeführt wurden (Abschn. 3.5.3).

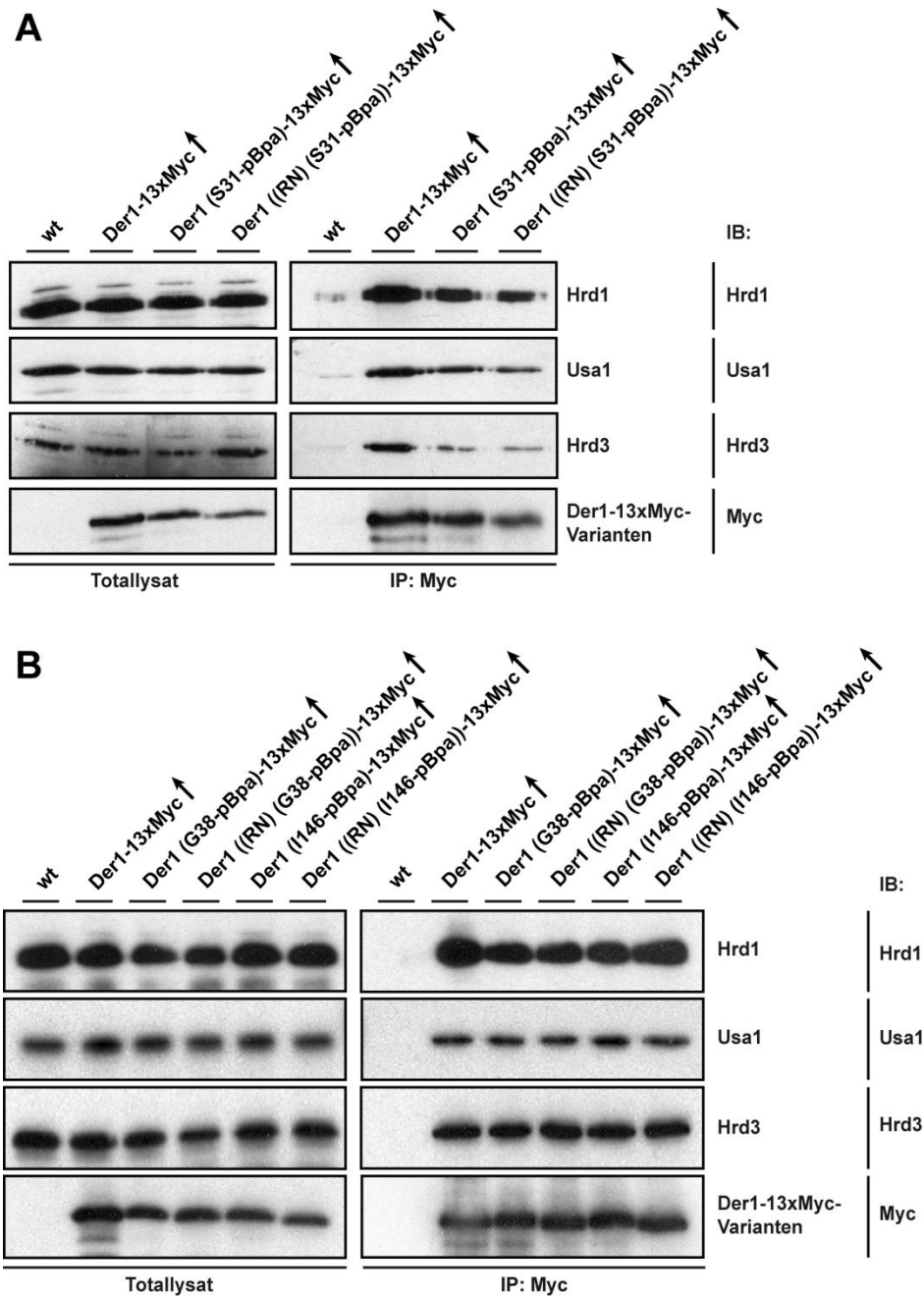


Abb. 3.42: Die pBpa-Modifizierungen von Der1 (R17LN73L)-13xMyc haben keinen Einfluss auf die Integration des Proteins in die HRD-Ligase. Ko-IP zum Einfluss der pBpa-Modifikation auf die Interaktion der Der1 TM-Mutante mit den Untereinheiten der HRD-Ligase (A und B). Für die Ko-IP wurden dieselben pBpa-modifizierten Der1 (R17LN73L (RN))-13xMyc-Varianten eingesetzt, mit denen zuvor die *Crosslinking*-Experimente durchgeführt wurden. Die Der1-Konstrukte wurden in $\Delta der1$ Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen überexprimiert (\uparrow) und mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper präzipitiert.

Des Weiteren sollte mittels Ko-IP überprüft werden, ob das verstärkte CPY*-*Crosslinking* am Aminosäurerest G38 auf eine stärkere Interaktion der pBpa-modifizierten TM-Mutante mit dem Substrat zu erklären ist.

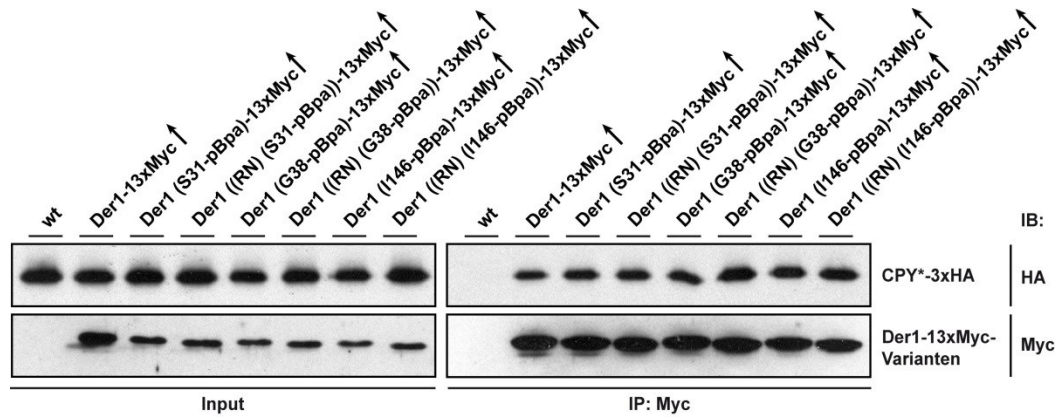


Abb. 3.43: Die pBpa-Modifizierungen von Der1 (R17LN73L)-13xMyc beeinträchtigen nicht die Wechselwirkung mit CPY*. Für die Ko-IP wurden dieselben pBpa-modifizierten Der1 (R17LN73L (RN))-13xMyc-Varianten eingesetzt, mit denen zuvor die *Crosslinking*-Experimente durchgeführt wurden. Die Der1-Konstrukte wurden wie für das *Crosslinking* in Δ der1 Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen überexprimiert (\uparrow) und mittels monoklonaler α -Myc-Antikörper präzipitiert.

In Abb. 3.43 ist kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf die Substratbindung zwischen den Der1-Varianten zu erkennen. Während CPY* in den *Crosslinking*-Experimenten unterschiedlich stark an verschiedenen Positionen mit Der1 quervernetzt wurde, konnten in der Ko-IP gleiche Mengen an CPY* mit den verschiedenen pBpa-modifizierten Der1-Varianten gefällt werden. Somit scheinen weder die Mutationen in den TM-Domänen noch die pBpa-Modifizierung von Der1 einen wesentlichen Einfluss auf die Substratwechselwirkung zu haben. Der1((R17LN73L) (G38-pBpa))-13xMyc wies im Vergleich zu den anderen Der1-Varianten eine etwas stärkere Interaktion zu CPY* auf. Im Gegensatz zum *Crosslinking*-Experiment war hier allerdings nur eine schwache Zunahme der CPY*-Bindung zu beobachten, so dass das verstärkte CPY*-*Crosslinking* wahrscheinlich nicht auf eine höhere Substrataffinität dieser Der1-Variante zurückzuführen ist.

Im Folgenden sollte der Effekt der TM-Mutationen auf die *Crosslinking*-Reaktionen an weiteren Aminosäureresten von Der1 untersucht werden. Neben der ersten TM-Domäne bilden auch einige Positionen in der zweiten TM-Domäne *Crosslinks* zu Hrd1 aus (Abschn. 3.6.3).

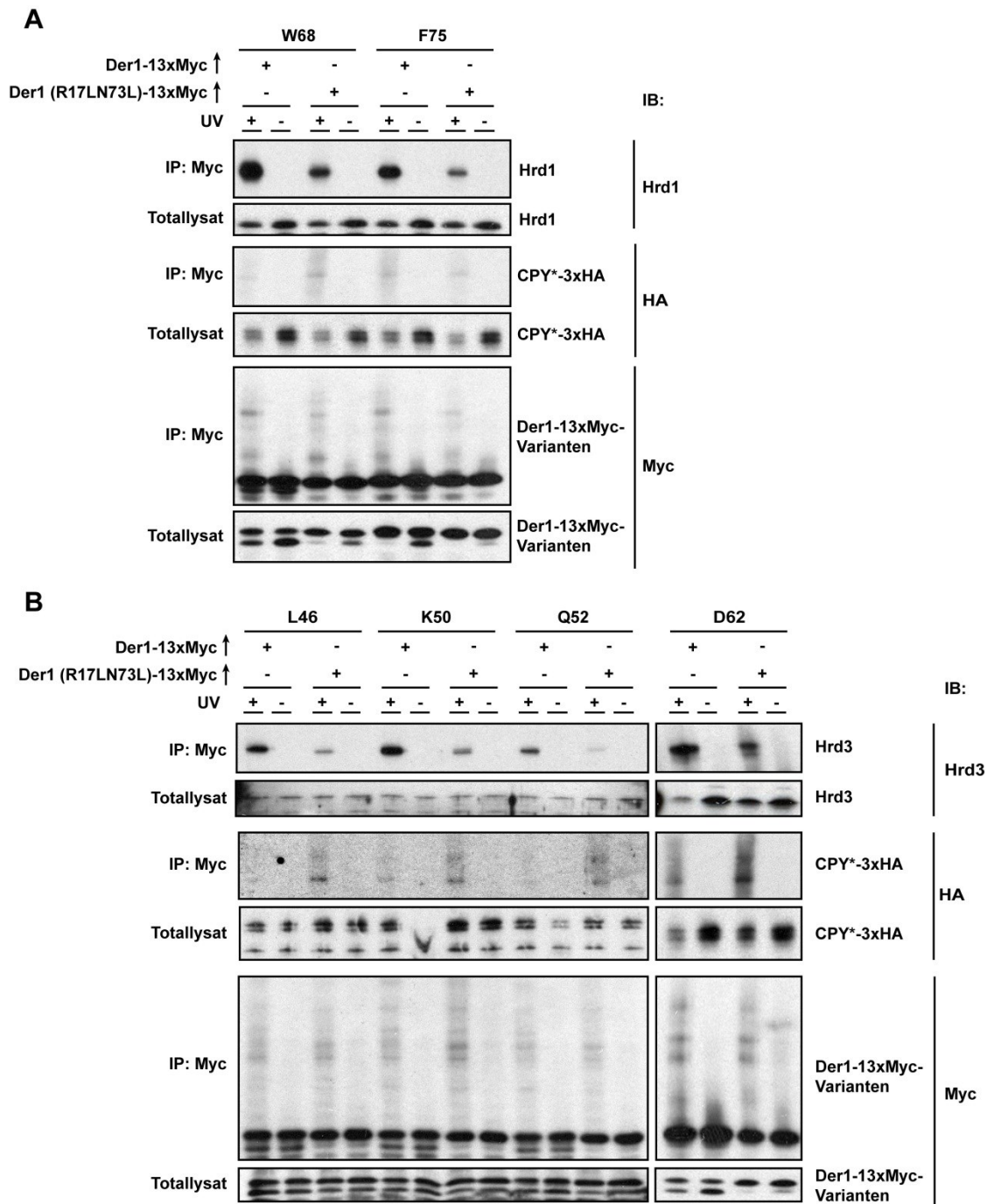


Abb. 3.44: Mutationen in den TM-Domänen beeinflussen das Hrd1- und Hrd3-Crosslinking an weiteren Positionen im TM- und luminalen Bereich von Der1-13xMyc. *Crosslinking*-Experiment zum Einfluss der TM-Mutationen auf Hrd1- und CPY*-3xHA-Quervernetzungen in der zweiten TM-Domäne (A). *Crosslinking*-Experiment zum Einfluss der TM-Mutationen auf das Hrd3- und CPY*3xHA-Crosslinking in der luminalen Schleife von Der1 (B). Δ der1 Ubc7 (C89S) CPY*-3xHA-Zellen wurden mit pBpa-modifizierten Der1-13xMyc-Varianten transformiert und das *Crosslinking* wie in den Experimenten zuvor durchgeführt. Die Der1-Konstrukte wurden überexprimiert (↑).

Bei einer Expression der Der1 TM-Mutante konnte deutlich weniger Hrd1 an den Positionen W68 und F75 in der zweiten TM-Domäne quervernetzt werden (Abb. 3.44 (A)). Hierbei war die Abnahme des *Crosslinking*-Signals vergleichbar mit der Wirkung der TM-Mutante auf die Hrd1-Quervernetzung in der ersten TM-Domäne. Dagegen wurden die

schwachen *Crosslinking*-Reaktionen zu CPY*-3xHA nicht signifikant durch die Mutationen beeinflusst. Anschließend wurde der Effekt der TM-Mutationen auf das Hrd3-*Crosslinking* an weiteren Positionen, vor allem in der luminalen Schleife von Der1, analysiert. Im Gegensatz zum Aminosäurerest G38 kam es an den nachfolgenden Positionen sowohl im luminalen Bereich (L46, K50 und Q52) als auch in der zweiten TM-Domäne (D62) zu einer starken Abnahme des *Crosslinking*-Signals (Abb. 3.44 (B)). Obwohl nur schwache Quervernetzungen zu CPY*-3xHA erkennbar waren, konnte ähnlich zur Position G38 mehr Substrat mit den Aminosäureresten der luminalen Schleife quervernetzt werden. Auch an der Position D62, die nach Topologie-Vorhersagen bereits in der zweiten TM-Domäne liegen sollte, war ein verstärktes Substrat-*Crosslinking* zu beobachten.

3.6.8 Die Deletion von *USA1* führt zu einer Reduktion der CPY*-3xHA-*Crosslinks* in der luminalen Schleife der Der1 (R17LN73L)-Mutante

Die Mutation der Der1 TM-Domänen führt zu einer verstärkten *Crosslinking*-Reaktion zu CPY*-3xHA in der luminalen Schleife von Der1, was möglicherweise auf eine Blockierung des Substratexports nach der Rekrutierung zur HRD-Ligase zurückzuführen ist. Es sollte daher getestet werden, ob die Zunahme des CPY*-3xHA-*Crosslinks* abhängig ist von der Integration der Der1 (R17LN73L)-Mutante in die HRD-Ligase. Hierzu wurde das *Crosslinking*-Experiment in einer *USA1*-Deletionsmutante durchgeführt, in der eine Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase nicht mehr möglich ist.

Bei einer Deletion von *USA1* konnte nur noch geringfügig mehr CPY*-3xHA mit der Der1 TM-Mutante quervernetzt werden (Abb. 3.45). Somit bewirkte die Abtrennung von der HRD-Ligase eine Angleichung der quervernetzten CPY*-3xHA-Menge auf der luminalen Seite an der Position G38 zwischen wt-Der1 und der TM-Mutante. An den Aminosäureresten in der ersten (S31) und vierten (I146) TM-Domäne war bereits bei einer vollständigen Integration von Der1 in die HRD-Ligase kein wesentlicher Unterschied zwischen wt-Der1 und Der1 (R17LN73L) erkennbar (Abschn. 3.6.7). So hatte schließlich auch die *USA1*-Deletion keinen weiteren Einfluss auf die CPY*3xHA-*Crosslinks* in diesen TM-Bereichen.

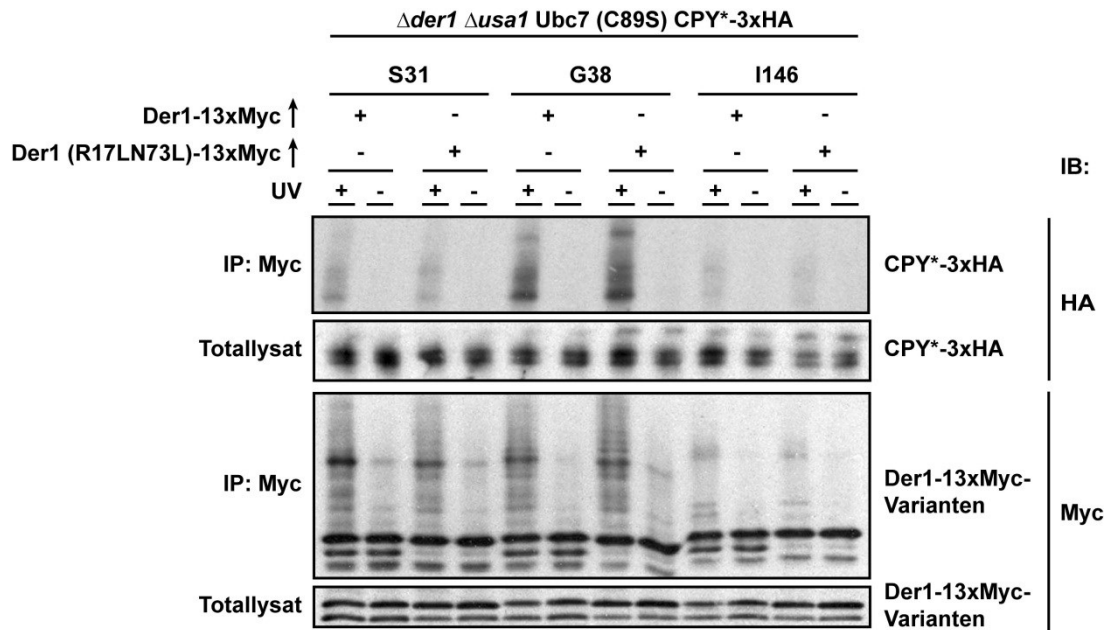


Abb. 3.45: Die Deletion von *USA1* führt zu einer Angleichung der quervernetzten CPY*-3xHA-Menge zwischen wt-Der1 und der Der1 TM-Mutante. Das *Crosslinking*-Experiment wurde in einem $\Delta der1 \Delta usa1 Ubc7 (C89S) CPY^*-3xHA$ -Stamm durchgeführt, der mit pBpa-modifiziertem Der1-13xMyc oder Der1 (R17LN73L)-13xMyc transformiert war. Die Der1-Konstrukte wurden überexprimiert (↑).

4 Diskussion

Nach der Erkennung im ER-Lumen müssen fehlgefaltete Proteine des sekretorischen Weges durch die ER-Membran in das Zytosol transportiert werden. Dort werden sie von den Ubiquitinligasen des ERAD-Systems ubiquitiniert und anschließend über das 26S Proteasom abgebaut. Der Transportmechanismus sowie die Zusammensetzung des Exportsystems im ER sind bisher noch unklar. Ein Abbaukomplex des ERAD-Systems ist die HRD-Ligase, welche aus mehreren Untereinheiten besteht. Eine dieser Untereinheiten stellt das integrale Membranprotein Der1 dar, das über das Gerüstprotein Usa1 mit der Ubiquitinligase Hrd1 assoziiert ist. Der1 ist ausschließlich beim Abbau luminaler ERAD-Substrate beteiligt und wird daher in der Literatur als mögliche Komponente eines ER-Exportkanal diskutiert.

In dieser Arbeit wurde zum einen eine genaue Analyse der Oligomerbildung und der Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase durchgeführt. Zum anderen wurden mithilfe einer Mutationsanalyse und einer Untersuchung der topologischen Ausrichtung von Der1 zu den Komponenten der HRD-Ligase Erkenntnisse über die Funktion von Der1 bei der Dislokation und dem Abbau luminaler ERAD-Substrate gewonnen.

4.1 Integration von Der1 in die HRD-Ligase

4.1.1 Die Stabilität und Interaktion von Der1 mit der HRD-Ligase wird durch Usa1 vermittelt

Die Interaktionen zwischen den Untereinheiten der HRD-Ligase werden vorwiegend über die löslichen Domänen der einzelnen Komponenten vermittelt. So wechselwirkt Hrd3 über den löslichen luminalen Bereich mit Hrd1, während Usa1 über den zytosolischen C- bzw. N-Terminus mit den direkten Interaktionspartnern Der1 und Hrd1 interagiert [35,55]. Dies deutet darauf hin, dass auch Der1 über eine lösliche zytosolische Domäne mit Usa1 wechselwirkt. Der1 weist wie Usa1 als Typ III-Membranprotein einen zytosolischen C- und N-Terminus auf. Der N-Terminus umfasst lediglich 12 Aminosäuren und ist Teil der ER-Signalsequenz des Proteins. Eine Epitop-Markierung des N-Terminus scheint daher die Insertion des Proteins in die ER-Membran zu stören und schließlich den Abbau des Proteins über das ERAD-System einzuleiten (Abschn. 3.2.1). Der zytosolische C-Terminus stellt mit einer Länge von 46 Aminosäuren die größte lösliche Domäne von Der1 dar. Eine Deletion dieses Bereiches verhindert die Bindung an Usa1, was eine Beteiligung des C-Terminus an der Usa1-Interaktion nahelegt (Abschn. 3.2.2). Weiterhin zeigte die

Fusion des C-terminalen Bereiches von Der1 an das Der1-Homolog in *S. cerevisiae*, Dfm1, dass die Fähigkeit der Usa1-Bindung auf andere ER-ständige Proteine, die *per se* nicht direkt mit Usa1 interagieren, übertragbar ist und der C-Terminus damit aktiv die Usa1-Interaktion vermittelt (Abschn. 3.2.4). Anhand eines Sequenzvergleiches mit Der1-Homologen aus anderen Organismen konnte ein konserviertes Motiv (GHxxYY) im mittleren Bereich des C-Terminus identifiziert werden. Interessanterweise beeinträchtigten Punktmutationen in diesem Motiv die Wechselwirkung mit Usa1 (Abschn. 3.2.3). Insbesondere die Aminosäurereste GH183/184 scheinen für die Usa1-Interaktion von großer Bedeutung zu sein, da eine Mutation die Bindung an Usa1 verhinderte. In dem Säugerhomolog Derlin-1 ist das entsprechende Glycin Bestandteil eines GxxxG-Motivs, das unter anderem zur Funktion von Rhomboid-Proteasen beiträgt. Die Mutation des G176 im GxxxG-Motiv hatte eine Stabilisierung des ERAD-Substrats NHK in Säugerzellen zur Folge, was die Autoren mit einem Funktionsverlust von Derlin-1 begründeten [64]. Allerdings wurde in dieser Studie nicht der Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Interaktion mit HERP, dem Usa1-Homolog und damit putativen direkten Interaktionspartner von Derlin-1 in Säugerzellen, untersucht. Somit ist es möglich, dass der Abbaufekt eher auf einen Verlust der HERP-Bindung als auf eine direkte Beeinträchtigung der Derlin-1-Funktion zurückzuführen ist. Für Derlin-1 wird mittlerweile eine zu Der1 alternative Topologie mit sechs TM-Domänen angenommen [64]. Das GxxxG-Motiv befindet sich hierbei im 6. TM-Bereich und dient in aktiven Rhomboid-Proteasen zur Dimerisierung mit der 4. TM-Domäne, um dadurch die Aminosäurereste des aktiven Zentrums (Ser-His-Dyade) zusammenzuführen [108,109]. Da eine Deletion unmittelbar nach dem GHxxYY-Motiv bereits die Interaktion zu Usa1 stark beeinträchtigte, scheint das Motiv allein nicht die Bindung an Usa1 vermitteln zu können (Abschn. 3.2.2). Stattdessen könnte es eine bestimmte Konformation im C-Terminus induzieren oder stabilisieren, was schließlich die Interaktion zu Usa1 ermöglicht. Es kann daher zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass sich das GHxxYY-Motiv in einer weiteren TM-Domäne von Der1 befindet und das Protein damit eine ähnliche Topologie wie Derlin-1 aufzeigt. Alle bisherigen biochemischen Untersuchungen sowie verschiedene Hydropathie-Diagramme weisen jedoch auf die Ausbildung von nur vier TM-Domänen in Der1 hin. Zudem ist das membranständige GxxxG-Motiv in Der1 nicht vollständig ausgebildet, da hier das N-terminale und hochkonservierte Glycin fehlt. Dennoch sollten in zukünftigen Experimenten die Lage und Anzahl der TM-Domänen sowie der Einfluss der GH183/184LA-Mutation auf die Topologie von Der1 vor allem im C-terminalen Bereich genauer untersucht werden.

Aus einer früheren Studie ist bereits bekannt, dass die Der1-Proteinmenge in Abwesenheit von Usa1 stark reduziert ist [55]. Anhand eines Cycloheximid-Experiments konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Der1 in $\Delta usa1$ -Zellen über einen Zeitraum

von 60 min abgebaut wird. Eine komplette Stabilisierung von Der1 konnte erst durch die Deletion der beiden Ubiquitinligasen *HRD1* und *DOA10* erzielt werden (Abschn. 3.1.1). Somit scheint der Abbau von Der1 in Δ *usa1*-Zellen über beide Ligase-Komplexe des ERAD-Systems zu erfolgen. Da Usa1 für die Proteolyse aller bisher bekannten membranständigen ERAD-Substrate benötigt wird, konnte Der1 als erstes Membranprotein identifiziert werden, das unabhängig von Usa1 über die HRD-Ligase abgebaut wird. Integrale Membranproteine mit Fehlfaltungen in zytosolischen Domänen werden vorzugsweise durch Doa10 abgebaut, während Hrd1 den Abbau von Substraten induziert, die Faltungsdefekte in Membranbereichen oder luminalen Domänen aufweisen [22]. Der1 und Usa1 wechselwirken über ihren jeweiligen zytosolischen C-Terminus miteinander. Die fehlende Wechselwirkung mit Usa1 könnte daher eine Konformationsänderung im zytosolischen Der1 C-Terminus hervorrufen, was schließlich zum Abbau über die Doa10-Ligase führt. Ebenso könnten sich Strukturänderungen im C-Terminus auch auf die TM-Domänen auswirken und damit den Abbau über Hrd1 induzieren. Dies würde die Beteiligung beider Abbaukomplexe bei der Proteolyse von Der1 in Δ *usa1*-Zellen erklären. Ein weiterer Hinweis zur Bedeutung des Der1 C-Terminus für die Stabilität von Der1 folgt aus der Beobachtung, dass die Expression und Bindung des zytosolischen Usa1 C-Terminus an Der1 bereits genügt, um das Protein in Δ *usa1*-Zellen zu stabilisieren (Abschn. 3.1.2). Die Wechselwirkung der jeweiligen C-Termini beider Proteine scheint daher eine stabile Konformation von Der1 zu ermöglichen. Dies bedeutet weiterhin, dass eine vollständige Integration von Der1 in die HRD-Ligase und die Assoziation mit weiteren Komponenten über den TM- oder luminalen Bereich für die Stabilität von Der1 nicht entscheidend ist. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend verursachten Mutationen im C-terminalen Usa1-Interaktionsmotiv (GHxxYY) von Der1 eine Destabilisierung des Proteins, was schließlich auf den Verlust der Usa1-Interaktion zurückzuführen ist (Abschn. 3.2.3). Letztendlich vermittelt der Usa1 C-Terminus also nicht nur die Rekrutierung von Der1 zur HRD-Ligase, sondern auch die Stabilität von Der1.

4.1.2 Usa1 vermittelt als Strukturkomponente die Oligomerisierung von Der1

Es ist bereits bekannt, dass Der1 wie auch andere Komponenten der HRD-Ligase oligomere Strukturen ausbildet (Abb. 3.8) [59]. Die Größe des Der1-Oligomers konnte jedoch weder in früheren Studien noch in dieser Arbeit ermittelt werden. So hatte in einer Gelfiltration die Deletion von *DER1* keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Usa1 (Abb. 3.9). Eine Erklärung hierfür könnte das geringe Molekulargewicht von Der1 sein. Im Falle eines Der1-Dimers wäre eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens der restlichen

HRD-Ligase-Komponenten nur schwer nachzuweisen. Ebenso ist es möglich, dass sowohl die Der1-Oligomerisierung als auch die Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase sehr dynamisch sind und daher keine distinkte Größe des Der1-Oligomers ermittelt werden kann. Ein Hinweis für die Dynamik der Der1-Assoziation und -Oligomerisierung könnte das Auftreten der zweiten Der1-Fraktion im niedermolekularen Bereich sein. Der1 würde demnach erst dann verstärkt zur HRD-Ligase rekrutiert werden, wenn es für den Abbau spezieller Substrate benötigt wird. Auf diese Weise könnte sich die Komposition der HRD-Ligase den unterschiedlichen Anforderungen für den Abbau verschiedener Substrate anpassen. Um weitere Anhaltspunkte für eine dynamische Assemblierung des Abbaukomplexes zu erhalten, sollte in weiteren Experimenten die Assoziation von Der1 mit der HRD-Ligase unter verschiedenen Bedingungen, z.B. unter ER-Stress oder bei einer Überexpression eines Der1-abhängigen Substrats, untersucht werden.

Aus der Erkenntnis, dass Der1 Oligomere ausbildet, ergab sich die Fragestellung, welche Faktoren der HRD-Ligase für die Ausbildung des Der1-Oligomers bedeutend sind. Mithilfe von Ko-IP-Experimenten, konnte gezeigt werden, dass der direkte Interaktionspartner Usa1 für die Oligomerisierung von Der1 notwendig ist (Abb. 3.10). Folglich waren C-terminal verkürzte Der1-Varianten sowie Der1-Punktmutanten, die nicht mehr mit Usa1 interagieren können, defizient in der Ausbildung von Oligomeren (Abschn. 3.3.3). Der Einfluss von Usa1 auf die Der1-Oligomerisierung kann hierbei jedoch nicht auf eine Destabilisierung der Der1-Varianten in Abwesenheit von Usa1 erklärt werden. Die Ko-Expression von Der1-13xMyc und wt-Der1 führte zu einer Stabilisierung beider Der1-Varianten in $\Delta usa1$ -Zellen (Abb. 3.11 (A)). Der1-13xMyc beeinträchtigte zwar den Abbau luminaler ERAD-Substrate, hatte aber keinen Einfluss auf den Abbau membranständiger Substrate (Abb. 3.11 (B)). Daher ist die Stabilisierung der Der1-Varianten nicht auf eine Hemmung der Proteolyse von Membranproteinen durch Der1-13xMyc zurückzuführen. Während für wt-Der1 nur bei einer Ko-Expression mit Der1-13xMyc eine Stabilisierung in $\Delta usa1$ -Zellen beobachtet werden konnte, war für Der1-13xMyc eine Stabilisierung ohne Ko-Expression möglich. So scheint die Markierung des C-Terminus von Der1 mit einem 13xMyc-Epitop die Struktur des Proteins zumindest lokal so zu beeinflussen, dass eine Erkennung und/oder Abbau des Proteins über das ERAD-System nicht mehr möglich ist. Da Der1-13xMyc jedoch vollständig in die HRD-Ligase integriert ist, scheint die Epitop-Markierung keine generelle Strukturveränderung des Proteins zu bewirken. Dagegen kann die Stabilisierung von wt-Der1 bei einer Ko-Expression mit Der1-Varianten eventuell mit einer erhöhten Proteinmenge von Der1 unter diesen Bedingungen begründet werden. Demnach könnte ein Anstieg der Proteinmenge durch die Ko-Expression den Abbaukomplex überlasten und somit eine Verzögerung des Abbaus bewirken. Ein Hinweis hierfür ist die Stabilisierung von wt-Der1 und funktionellem Der1-1xHA bei einer

Ko-Expression beider Der1-Varianten in Δ *usa1*-Zellen. Die Einzelexpression von wt-Der1 und Der1-1xHA hatte hingegen einen Abbau beider Konstrukte in Δ *usa1*-Zellen zur Folge (Abb. 3.12 (B)).

Eine weitere Erhöhung der Proteinmenge durch die Überexpression von Der1 unter ER-Stressbedingungen induzierte eine *Usa1*-unabhängige Der1-Oligomerisierung (Abschn. 3.3.6). Selbst die Deletion der größten löslichen Domäne von Der1, des C-Terminus, hatte keinen Einfluss auf die Oligomerbildung. Somit scheinen die TM-Domänen eine schwache Affinität zueinander aufzuweisen, die unter starken Expressionsbedingungen eine Selbstoligomerisierung von Der1 ermöglicht. Auch für Hrd1 konnte bei einer Überexpression eine *Usa1*-unabhängige Oligomerisierung beobachtet werden [73]. Sowohl *DER1* als auch *HRD1* zählen zu den Zielgenen der UPR und werden daher bei ER-Stress hochreguliert [37]. Eine Funktion der Selbstoligomerisierung von Der1 und Hrd1 könnte darin liegen, dass unter ER-Stressbedingungen eine stärkere Oligomerisierung der HRD-Ligase-Komponenten benötigt wird, um einen möglichst effizienten Abbau von Substraten zu erzielen und so eine Anreicherung fehlgefalteter Proteine im ER zu verhindern. Diese Vorstellung würde das Modell einer dynamischen Assemblierung und Oligomerisierung der HRD-Ligase bestätigen. Das Prinzip der Flexibilität und Dynamik scheint nicht nur auf den Abbaukomplex des ERAD-Systems beschränkt zu sein. So ist der Importkomplex der Peroxisomen in der Lage, sich mithilfe einer dynamischen Oligomerisierung der Größe des Matrixproteins anzupassen [90]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Der1 wie Hrd1 eine Neigung zur Selbstoligomerisierung aufweist und bei einer Überexpression unabhängig von anderen Komponenten Oligomere ausbildet. Unter natürlichen Expressionsbedingungen allerdings ist *Usa1* als Strukturkomponente für die Stabilisierung des Der1-Oligomers notwendig.

4.1.3 *Usa1* dient als zentrales Gerüstprotein für die Assemblierung der HRD-Ligase

Neben der Funktion als Bindeglied zwischen Der1 und Hrd1 ist *Usa1* auch für die Ausbildung und Stabilisierung von Der1- und Hrd1-Oligomeren verantwortlich. Interessanterweise bildet *Usa1* selber Oligomere aus und zwar unabhängig von den direkten Interaktionspartnern Hrd1 und Der1 (Abb. 3.14 (A), [55]). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Selbstoligomerisierung von *Usa1* über den N-Terminus des Proteins stattfindet (Abb. 3.14 (B)). Dies wirft die Frage auf, ob die Selbstoligomerisierung von *Usa1* die Oligomerbildung von Der1 und Hrd1 induziert. Tatsächlich wurde kürzlich ein Bereich im N-Terminus (372-418) von *Usa1* identifiziert, der sowohl die Selbstoligomerisierung von *Usa1* als auch die Ausbildung des Hrd1-Oligomers vermittelt [73]. Im

Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich auch für die Oligomerisierung von Der1 notwendig ist (Abb. 3.16 (C)). Diese Erkenntnis erweitert schließlich das Modell zur Zusammensetzung und Oligomerisierung der HRD-Ligase. Demnach ist Usa1 in der Lage, unabhängig von anderen Komponenten der HRD-Ligase Oligomere auszubilden. Durch die Selbstoligomerisierung von Usa1 wird die Oligomerbildung der beiden Interaktionspartner Der1 und Hrd1 induziert, die über den C- bzw. N-Terminus von Usa1 rekrutiert werden. Auf diese Weise wirkt Usa1 als zentrales Gerüstprotein für die Assemblierung und Oligomerisierung der HRD-Ligase (Abb. 4.1). Während für den Abbau von Membranproteinen die HRD-Ligase als Oligomer vorliegen muss, konnte entgegen einer Studie von Carvalho et al. [73] eine funktionelle Bedeutung der Oligomerisierung von Der1 bzw. der HRD-Ligase für die Proteolyse von luminalen ERAD-Substraten nicht festgestellt werden (Abschn. 3.3.7, [55]). Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass die in der erwähnten Studie verwendete Usa1-Mutante, die eine Oligomerbildung der HRD-Ligase verhindert, nur sehr schwach exprimiert wird und dadurch der Abbau von Substraten beeinträchtigt ist. Die Rekrutierung von Der1 an die HRD-Ligase durch ein Hrd1-Usa1C-Fusionsprotein ist allein jedoch nicht ausreichend, um luminalen ERAD-Substrate wie CPY* abzubauen (Abschn. 3.3.8). So scheinen auch die TM-Bereiche von Usa1 für die Funktionsfähigkeit der HRD-Ligase eine Rolle zu spielen, indem sie möglicherweise für eine korrekte sterische Anordnung der Untereinheiten des Abbaukomplexes erforderlich sind.

Die Beobachtung, dass eine Oligomerisierung der HRD-Ligase für den Abbau von luminalen Substraten nicht benötigt wird, ist mit Hinblick auf eine mögliche Kanalfunktion der HRD-Ligase zunächst überraschend. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass die Notwendigkeit der Oligomerisierung nur für den CPY*-Abbau getestet wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass für die Proteolyse von größeren und strukturell komplexeren Substraten eine Oligomerisierung der HRD-Ligase notwendig ist. Die strukturelle Anpassung der HRD-Ligase an das jeweilige Substrat würde wiederum die Flexibilität und Dynamik des Abbaukomplexes unterstreichen.

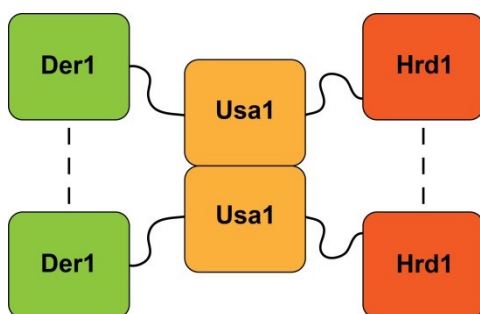


Abb. 4.1: Modell zur Oligomerisierung der HRD-Ligase.

Usa1 ist in der Lage, unabhängig von anderen Faktoren Oligomere auszubilden. Die Selbstoligomerisierung von Usa1 induziert die Oligomerbildung der direkten Interaktionspartner Der1 und Hrd1. Usa1 wirkt somit als zentrales Strukturelement für die Assemblierung der HRD-Ligase.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von Der1

Weder für Der1 noch für die Derlins ist bisher bekannt, welche Funktion sie im Abbauprozess ausüben und in welchem Schritt der Abbaukaskade sie beteiligt sind. Vor allem die Derlins sind in den vorangegangenen Studien fast ausschließlich nur genetisch charakterisiert worden. Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde erstmals ein ausführlicher biochemischer Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von Der1 durchgeführt.

4.2.1 Der1 ist an einem der Substratrekrutierung nachgeschalteten Schritt im Abbauprozess beteiligt

Sowohl Der1 als auch Derlin-1 wechselwirken mit Substraten [64,66]. Dabei ist Der1 in der Lage, unabhängig vom Substratrezeptor Hrd3 mit luminalen ERAD-Substraten zu interagieren [35]. Es wurde daher vermutet, dass Der1 neben dem Hrd3-Yos9-Komplex einen weiteren Substratrezeptor darstellt und das Substrat somit über zwei unabhängige Wege zu Hrd1 rekrutiert wird. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass eine $\Delta der1 \Delta hrd3$ -Doppelmutante den Abbau von CPY* nicht stärker beeinträchtigt als die entsprechenden Einzelmутanten (Abb. 3.23 (A)). Zudem hatte die Deletion von *DER1* keinen Einfluss auf die Substratbindung von Hrd1, was gegen eine entscheidende Rolle von Der1 bei der Substratrekrutierung zur HRD-Ligase spricht (Abb. 3.23 (B)). Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine unabhängige Funktion von Der1 und Hrd3 bei der Substratrekrutierung eher unwahrscheinlich ist. Vielmehr ist es möglich, dass Der1 in einem der Substratbindung nachgeschalteten Schritt wirkt. So könnte Der1 nach der Substratrekrutierung, die über Hrd3 erfolgt, zunächst eine vorzeitige Dissoziation des Substrats vom Abbaukomplex mithilfe der eigenen Bindungsaffinität verhindern und dann das Substrat für den Transport in das Zytosol zu weiteren Komponenten der HRD-Ligase weiterleiten.

4.2.2 Mutationen in den TM-Domänen von Der1 blockieren die Dislokation und den Abbau luminaler ERAD-Substrate

Laut Topologievorhersagen weist Der1 weder exponierte luminalen Bereiche noch größere zytosolische Domänen auf. Ein großer Teil des Proteins besteht demnach aus TM-Domänen. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die TM-Domänen nur ein Strukturelement darstellen oder in einem Abbauschritt, wie z.B. dem Export, aktiv beteiligt sind. Der N-terminale Bereich des Proteins, der die ersten beiden TM-Domänen umfasst,

weist die höchste Dichte an konservierten Aminosäuren auf. Tatsächlich führten Punktmutationen in diesen TM-Domänen zu einer Stabilisierung von ERAD-Substraten (Abschn. 3.5.1). Hierbei war der stärkste Abbaudefekt bei einer Doppelmutante zu beobachten, in der eine konservierte hydrophile Aminosäure in der ersten und in der zweiten TM-Domäne mutiert wurde (Der1 R17LN73L) (Abb. 3.25 (A, B)). Der Effekt der TM-Mutanten wirkte sich ausschließlich auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate aus, so dass die Proteolyse von Membranproteinen nicht beeinflusst (Abb. 3.25 (C)) wurde. Daher ist der Abbaudefekt nicht auf eine allgemeine Inhibierung der HRD-Ligase-Aktivität, sondern auf eine funktionelle Beeinträchtigung von Der1 zurückzuführen. Da die Mutationen weder die Integration von Der1 in die HRD-Ligase noch die Stabilität des Proteins störten, scheinen sich die Mutationen nicht wesentlich auf die Struktur oder die Topologie von Der1 auszuwirken (Abschn. 3.5.3). Dies deutet schließlich auf eine funktionelle Bedeutung der TM-Domänen für Der1 und den Abbauprozess hin. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den TM-Domänen zu einer Anreicherung von CPY* im ER-Lumen führen, was eine Störung der Protein-Dislokation in das Zytosol nahelegt (Abschn. 3.5.4). Der Exportdefekt konnte auch anhand einer reduzierten Ubiquitinierung von CPY* in den TM-Mutanten belegt werden (Abschn. 3.5.5). Interessanterweise wurde für eine TM-Mutante (Der1 R17LC23L), die eine deutliche Stabilisierung luminaler Substrate hervorruft, weiterhin eine recht effiziente Substratubiquitinierung beobachtet. Da die ubiquitinierte Fraktion des Substrats in dieser Mutante membranassoziiert war, könnte es sich hierbei um ein Transportintermediat handeln, bei dem der Exportschritt stark verzögert oder sogar arretiert ist, so dass Teile des Substrats in das Zytosol ragen und damit der Ubiquitinierungsmaschinerie ausgesetzt sind (Abb. 3.31).

Letztendlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mutationen in den TM-Domänen von Der1 die Dislokation und dadurch den Abbau fehlgefalteter ER-luminaler Proteinen hemmen, was auf eine Funktion oder Beteiligung der TM-Domänen im Exportschritt der Abbaukaskade hindeutet. Neben den TM-Domänen weist auch die erste luminaire Schleife von Der1 mehrere konservierte Aminosäuren auf. Insbesondere im C-terminalen Bereich der Schleife befinden sich Teile eines konservierten Motivs, das sowohl in Rhomboid-Proteasen als auch in Derlin-1 zu finden ist [64]. Während in Derlin-1 die Mutation dieses Motivs zu einer Stabilisierung des ERAD-Substrats NHK führte, konnte für die entsprechenden Mutationen in Der1 kein Einfluss auf den Abbauprozess beobachtet werden (Tab. 3.1). Somit scheinen auch aufgrund der Tatsache, dass die Rhomboid-Motive nur teilweise und unvollständig in Der1 vorhanden sind, die funktionellen Erkenntnisse von Derlin-1 nicht ohne weiteres auf Der1 übertragbar zu sein. Dennoch wurde auch für die TM-Domänen von Derlin-1 postuliert, dass sie bei der

Funktion des Proteins als inaktive Rhomboid-Protease beteiligt sind, indem sie das Substrat auf eine bestimmte Weise so ausrichten, dass es dem ER-Export und dem Abbau zugefügt werden kann. Folglich scheinen die TM-Domänen nicht nur in Der1 sondern auch in dem entsprechenden Säugerhomolog eine gewisse Bedeutung für die Funktion des Proteins einzunehmen.

4.3 Einblick in die Topologie der HRD-Ligase durch zielgerichtetes *in vivo photocrosslinking* von Der1

4.3.1 Die TM-Domänen von Der1 sind mit Hrd1 assoziiert und könnten ein Teil des Exportkanals darstellen

Das zielgerichtete *in vivo photocrosslinking* stellt eine effektive Methode dar, um die dynamische Interaktion zwischen Proteinen und die räumliche Anordnung von Untereinheiten eines Proteinkomplexes auch während des Ablaufs einer zellulären Reaktion *in vivo* zu untersuchen.

Berichte aus der Literatur deuten darauf hin, dass Hrd1 nicht nur die Substratrekrutierung durch Hrd3 auf der luminalen Seite und die Ubiquitinierung von Substraten im Zytosol vermittelt, sondern auch eine zentrale Funktion bei der Dislokation von Substraten einnimmt. So konnte mittels zielgerichtetem *in vivo photocrosslinking* einer CPY*-Variante (sCPY*-DHFR) gezeigt werden, dass das Substrat an mehreren Positionen mit Hrd1 in Abhängigkeit von Hrd3 *Crosslinks* ausbildet [73]. Wurde das Experiment in einer Hrd1-Mutante durchgeführt, in der die vier C-terminalen TM-Domänen fehlten, war eine Quervernetzung zwischen dem Substrat und Hrd1 nicht mehr möglich. Infolgedessen wurde angenommen, dass die TM-Domänen von Hrd1 die *Crosslinking*-Reaktionen mit dem Substrat ausbilden und daher eine zentrale Komponente des Exportkanals darstellen könnten. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit eine räumliche Nähe der ersten beiden konservierten TM-Domänen von Der1 mit Hrd1 nachgewiesen werden (Abschn. 3.6.3). Vor allem der C-terminale Bereich der ersten TM-Domäne ist über einen längeren Abschnitt mit Hrd1 assoziiert. Die Deletion der zytosolischen Domänen von Hrd1 würde die Interaktion mit Usa1 und damit auch Der1 aufheben. Daher konnte nicht eindeutig belegt werden, dass die Quervernetzungen tatsächlich zwischen den TM-Domänen beider Proteine ausgebildet wurden. Da die *Crosslinks* zu Hrd1 ausschließlich in den putativen TM-Bereichen von Der1 auftraten, ist es allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Reaktion zwischen den Aminosäureresten der jeweiligen TM-Domänen erfolgte. Bei einer Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Bereiche von Der1 wies nur die

4. TM-Domäne eine räumliche Nähe zu Usa1 auf. Dies unterstreicht die Annahme aus Abschn. 3.2.2, dass der C-terminale Bereich von Der1 die Usa1-Interaktion vermittelt. Die Quervernetzungen von Hrd1 und Usa1 mit verschiedenen Bereichen von Der1 machen deutlich, dass die Der1-TM-Domänen nicht willkürlich in den Abbaukomplex integriert sind, sondern eine spezifische Ausrichtung zu bestimmten Komponenten der HRD-Ligase aufweisen. Außerdem lässt die teilweise recht starke Assoziation der ersten beiden TM-Domänen von Der1 mit den TM-Segmenten des putativen Exportkanals Hrd1 vermuten, dass Der1 und Hrd1 gemeinsam das Dislokon für den Transport fehlgefalteter Proteine aus dem ER ausbilden. Diese Hypothese würde mit den Ergebnissen der Der1 TM-Mutanten übereinstimmen, die eine Blockierung des Exports von luminalen Substraten aus dem ER hervorrufen.

In einer weiteren Studie zu Hrd1 konnte allerdings gezeigt werden, dass die Mutation von hydrophilen Aminosäuren in den TM-Domänen keinen Einfluss auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate hat, was zunächst einer Funktion der TM-Domänen als zentrale Komponente des Exportkanals widerspricht [72]. Stattdessen führten die Mutationen zu einer Stabilisierung bestimmter fehlgefalteter Membranproteine. Aufgrund dessen wurde postuliert, dass Fehlfaltungen in den TM-Bereichen von Membranproteinen durch hydrophile Reste in den TM-Domänen von Hrd1 erkannt und die Substrate auf diese Weise zum Abbaukomplex rekrutiert werden. Falls der Exportkanal aus den TM-Domänen verschiedener HRD-Ligase-Komponenten bestehen sollte, ist es möglich, dass die Mutation einzelner hydrophiler Aminosäuren nicht ausreicht, den Transportprozess zu stören und damit den Abbau von luminalen Substraten zu verzögern. Um die Bedeutung der Hrd1 TM-Domänen für den Export zu belegen, sollten in zukünftigen Experimenten mehrere hydrophile Aminosäuren oder komplette TM-Domänen von Hrd1 deletiert und der Einfluss dieser Mutanten auf den Abbau luminaler ERAD-Substrate untersucht werden.

4.3.2 Der1 ist auf der luminalen Seite mit dem Substratrezeptor Hrd3 assoziiert

Während die TM-Domänen von Der1 zusammen mit Hrd1 möglicherweise bei der Ausbildung eines Transportkanals in der ER-Membran beteiligt sind, konnte in der ersten luminalen Schleife von Der1 eine räumliche Nähe zur luminalen Domäne von Hrd3 festgestellt werden (Abschn. 3.6.3). Hrd3 wechselwirkt über Hrd1 und Usa1 mit Der1, so dass bisher von einer recht großen räumlichen Distanz zwischen beiden Komponenten in der HRD-Ligase ausgegangen wurde. Durch die sehr intensiven *Crosslinking*-Signale an mehreren Positionen von Der1 wird allerdings deutlich, dass die luminalen Bereiche beider Proteine über einen längeren Abschnitt miteinander assoziiert sind. Außerdem

wurden in der luminalen Schleife von Der1 auch Quervernetzungen zum Substrat CPY* beobachtet, die sich interessanterweise zum Teil mit den *Crosslinking*-Reaktionen zu Hrd3 überschneiden. Somit könnten Der1 und Hrd3 im ER-Lumen eine gemeinsame Oberfläche zur Bindung von Substraten an der HRD-Ligase ausbilden. Die Assoziation von Der1 mit CPY* war hierbei unabhängig von Hrd3, was mit Ergebnissen aus früheren Studien korreliert [35,36]. Entgegen der Annahme, dass die Deletion von *HRD3* zu einer Reduktion der *Crosslinking*-Intensität zu CPY* führt, verstärkte sich das Signal vor allem auf der luminalen Seite von Der1 (Abb. 3.38). Ein Grund hierfür könnte die Exposition von Substratbindestellen sein, die in einer intakten HRD-Ligase durch Hrd3 verdeckt sind. Der gleiche Effekt auf die Substratassoziation war auch in Δ *usa1*-Zellen zu beobachten (Abb. 3.39). Dies widerspricht einem Bericht aus der Literatur, in dem Substrat-Quervernetzungen zu Der1 in Abwesenheit von Usa1 nicht möglich waren [36]. Bei der Methode des zielgerichteten *in vivo photocrosslinking* ist jedoch zu beachten, dass die räumliche Nähe zwischen Proteinen nur an bestimmten Positionen betrachtet wird. Da in der Studie von Stanley et. al. [36] anstelle von Der1 eine Position im Substrat mit dem *Crosslinker* markiert wurde, könnten andere Bereiche als in dieser Arbeit miteinander quervernetzt worden sein. Die Deletion von *USA1* scheint daher die Assoziation des Substrats mit Der1 so zu beeinflussen, dass zumindest an einigen Positionen die Ausbildung von Quervernetzungen nicht mehr möglich ist. Ko-IP-Experimente mit C-terminal verkürztem Der1 belegten schließlich, dass Der1 unabhängig von der Rekrutierung zur HRD-Ligase über die luminalen Bereiche direkt mit CPY* interagiert und damit eine intrinsische Substrataffinität aufweist (Abb. 3.40 (A, B)). Eine Funktion dieser intrinsischen Substrataffinität könnte darin liegen, eine vorzeitige Dissoziation des Substrats von der HRD-Ligase zu verhindern und dadurch die Einführung des Substrats in einen Exportkanal zu ermöglichen, wie es bereits in Abschn. 4.2.1 postuliert wurde. Letztendlich ist festzuhalten, dass mithilfe des *in vivo photocrosslinking* erstmals Erkenntnisse über die sterische Anordnung der Untereinheiten der HRD-Ligase gewonnen werden konnten. Hierbei machte die räumliche Nähe der Der1-Domänen zu verschiedenen Komponenten der HRD-Ligase deutlich, dass Der1 ein zentraler Bestandteil des Abbaukomplexes ist. Außerdem zeigt die Assoziation der luminalen Bereiche von Der1 und Hrd3, dass die Untereinheiten der HRD-Ligase sehr kompakt angeordnet sind, was zur Effizienz des Abbauvorgangs beitragen könnte.

4.3.3 Die Der1 TM-Domänen befinden sich in räumlicher Nähe zum Substrat

Neben dem luminalen Bereich konnten auch in den TM-Domänen von Der1 *Crosslinking*-Reaktionen zu CPY* beobachtet werden (Abschn. 3.6.3). Dabei waren die Quervernetzungen ebenso vor allem auf der zum ER-Lumen zugewandten Seite zu finden. Ein Grund hierfür könnte in der Verwendung der katalytisch inaktiven Ubc7 (C89S)-Mutante in den *Crosslinking*-Experimenten liegen, die eine Ubiquitinierung des Substrats verhindert und dadurch nicht nur die Dislokation, sondern möglicherweise auch die Lage des Substrats im Exportkanal beeinflusst. Die Durchführung der *Crosslinking*-Experimente mit einer Mutante, die den Abbauprozess schwächer und an einem späteren Schritt hemmt, könnte zu einem veränderten *Crosslinking*-Muster von CPY* in den TM-Domänen führen. Die Verwendung der verschiedenen Mutanten würde es somit ermöglichen, den Ablauf des Transportvorgangs durch den putativen Exportkanal zu verfolgen. Eine weitere Ursache für die Konzentration der CPY*-*Crosslinks* auf der luminalen Seite könnte die Ausrichtung der TM-Domänen im Exportkanal sein, die dazu führt, dass das Substrat zuerst mit den TM-Domänen von Der1 in Kontakt kommt, während der zytosolische Bereich des Kanals durch die TM-Domänen anderer Komponenten (z.B. Hrd1) ausgekleidet wird. Im Gegensatz zu einigen Positionen im luminalen Bereich wurden in den TM-Domänen nur diffuse Quervernetzungen zum Substrat beobachtet. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass andere Komponenten der HRD-Ligase, z.B. die TM-Domänen von Hrd1, den zentralen Bereich des Exportkanals ausbilden. Die TM-Domänen von Der1 würden somit nur eine stabilisierende Komponente des Dislokons darstellen und kommen daher nicht intensiv mit dem Substrat in Kontakt. Dennoch könnte die Deletion von *DER1* die Ausbildung eines funktionsfähigen Exportkanals verhindern und auf diese Weise den Transport luminaler Substrate stören. Schließlich konnte durch die Quervernetzung der Der1 TM-Domänen mit einem Substrat erstmals ein klares Indiz für die Beteiligung der TM-Bereiche bei der Protein-Dislokation und bei der Ausbildung eines putativen Exportkanals in der ER-Membran erbracht werden.

4.3.4 Mutationen in den TM-Domänen beeinflussen die sterische

Ausrichtung von Der1 zur HRD-Ligase

Durch die Verwendung einer Der1 TM-Mutante (Der1 (R17LN73L)) in den *Crosslinking*-Experimenten wurden Anhaltspunkte über den Einfluss der Mutationen auf die sterische Ausrichtung von Der1 zu den Komponenten der HRD-Ligase erhalten. So beeinträchtigten die Mutationen deutlich die Assoziation der Der1 TM-Domänen mit Hrd1 (Abschn. 3.6.7). Da sich die Mutationen in der ersten und zweiten TM-Domäne befanden, war auch die Ausrichtung der ersten luminalen Schleife zu Hrd3 an einigen Positionen beeinflusst. Das

veränderte Laufverhalten der TM-Mutanten in der SDS-PAGE weist ebenfalls auf einen Effekt der Mutationen auf die Der1-Struktur hin (Abschn. 3.5.3). Die Beobachtung, dass weiterhin *Crosslinking*-Reaktionen der luminalen Schleife zu Hrd3, wenn auch in geringerer Intensität, möglich waren, lässt allerdings auf eine intakte Topologie der TM-Mutante schließen. Zudem hatten die Mutationen in den Ko-IP-Experimenten keinen Einfluss auf die Interaktion von Der1 mit HRD-Ligase-Komponenten (Abschn. 3.5.3). Somit scheinen die Mutationen nur diskrete Veränderungen in der Struktur von Der1 auszulösen. Besonders auffällig war die Zunahme des *Crosslinking*-Signals von CPY* an der Position Glycin (G) 38 in der ersten luminalen Schleife von Der1, während in den TM-Bereichen und an anderen Positionen im ER-Lumen kaum eine Veränderung der *Crosslinking*-Intensität beobachtet wurde. Die Zunahme der CPY*-Assoziation könnte zum einen darauf zurückgeführt werden, dass unter Berücksichtigung der intrinsischen Substrataffinität von Der1 die Zugänglichkeit der Position G38 zum Substrat durch die beeinträchtigte Assoziation mit Hrd3 erhöht ist. Ein ähnlicher Effekt auf die *Crosslinking*-Intensität von CPY* konnte auch in Abwesenheit von Hrd3 festgestellt werden (Abb. 3.38). Da die Zunahme des *Crosslinking*-Signals in diesem Fall allerdings wesentlich stärker ist als bei einer Deletion von *HRD3*, ist es wahrscheinlicher, dass in der TM-Mutante eine bestimmte CPY*-Fraktion im Bereich der Position G38 auf der luminalen Seite akkumuliert. Wenn Der1 eine Komponente des Exportkanals darstellt, könnte die veränderte sterische Ausrichtung der TM-Domänen zu Hrd1 dazu führen, dass der Kanal für das Substrat nicht mehr zugänglich ist und es daher zu einer Anreicherung von CPY* auf der luminalen Seite von Der1 kommt. Da die Position G38 nach einer Mutation der TM-Domänen den höchsten Anstieg der *Crosslinking*-Intensität aufwies, könnte dies den Bereich darstellen, der den Rand des Transportkanals ausbildet. Interessanterweise war die Zunahme des CPY*-*Crosslinks* bei G38 abhängig von der Integration des Der1 in die HRD-Ligase (Abschn. 3.6.8). Dies legt nahe, dass es sich bei der akkumulierten CPY*-Fraktion um ein Abbauintermediat handelt, das zuvor über die Substratrezeptoren der HRD-Ligase rekrutiert und dann für die Dislokation in das Zytosol zum Exportkanal weitergeleitet wurde.

4.4 Ein Modell zur Funktion von Der1 beim Abbau luminaler ERAD-Substrate

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen kann folgendes Modell zur Funktion von Der1 in der HRD-Ligase postuliert werden (Abb. 4.2): Fehlfaltete Proteine werden im ER-Lumen über den Substratrezeptorkomplex Hrd3/Yos9 zur HRD-Ligase rekrutiert. Die luminalen Bereiche von Hrd3 und Der1 befinden sich in einer räumlichen

Nähe zueinander und ermöglichen somit eine effiziente Weiterleitung des Substrats zum Exportkanal. Aufgrund einer intrinsischen Substrataffinität ist Der1 in der Lage, das Substrat hierbei zu binden und eine vorzeitige Dissoziation von der HRD-Ligase zu verhindern. Die Wechselwirkung mit Der1 erleichtert außerdem das Einführen des Substrats in den Exportkanal. Da die TM-Domänen von Der1 und Hrd1 in der ER-Membran miteinander assoziiert sind, könnten beide gemeinsam den Exportkanal der HRD-Ligase ausbilden. Die dynamische Oligomerisierung von Der1 und Hrd1 würde schließlich eine Anpassung des Exportkanals an die Größe des Substrats erlauben. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals deutliche Anhaltspunkte für eine zentrale Funktion von Der1 beim Export von ERAD-Substraten geben. Demnach stellt Der1 eine Strukturkomponente der HRD-Ligase dar, die auf der luminalen Seite nach der Substratrekrutierung durch Hrd3 bei der Weiterleitung des Substrats beteiligt ist und im TM-Bereich einen Teil des Exportkanals ausbildet. In gewisser Hinsicht weist dieses Modell Parallelen zum Importsystem in Peroxisomen auf. Der Importkanal in Peroxisomen setzt sich ebenfalls aus mehreren Komponenten in Abhängigkeit des zu transportierenden Substrats zusammen und vereint somit die verschiedenen Schritte des Importprozesses in einem Komplex. Des Weiteren passt sich der Kanal durch eine dynamische Assemblierung der einzelnen Komponenten der Größe des zu transportierenden Proteins an [90,92]. Die Kompaktheit und Dynamik beider Transportsysteme ermöglicht letztendlich den effizienten Transport einer Vielzahl strukturell sehr unterschiedlicher Proteine.

Für eine endgültige Identifizierung des Exportkanals des ERAD-Systems und eine detaillierte Charakterisierung des Transportmechanismus ist jedoch die Rekonstitution der HRD-Ligase *in vitro* notwendig. Dies würde unter anderem auch eine Visualisierung des Komplexes mittels Elektronenmikroskopie ermöglichen.

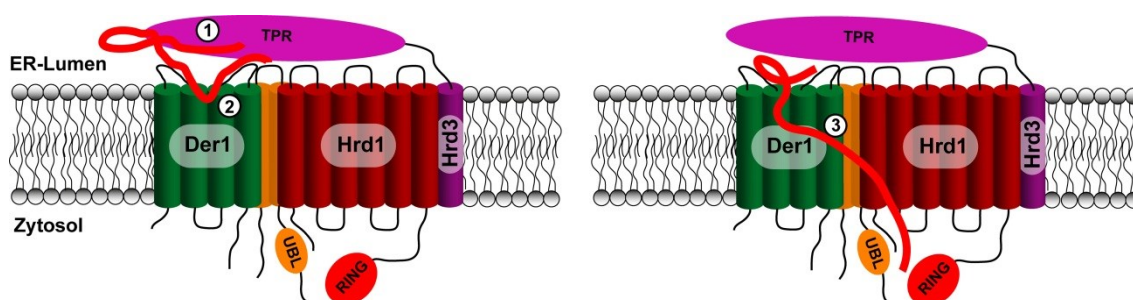


Abb. 4.2: Modell zur Funktion von Der1 in der HRD-Ligase. Der Substratrezeptor Hrd3 rekrutiert luminal ERAD-Substrate zur HRD-Ligase (1). Durch die Wechselwirkung mit den luminalen Bereichen von Der1 wird eine vorzeitige Dissoziation des Substrats von der HRD-Ligase verhindert und die Einführung in den Exportkanal induziert (2). Die TM-Domänen von Der1 und Hrd1 sind miteinander assoziiert und bilden gemeinsam den Exportkanal aus, durch den das Substrat schließlich in das Zytosol transportiert wird (3).

Literaturverzeichnis

1. Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J: **Cellular strategies of protein quality control.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**:a004374.
2. Buchberger A, Bukau B, Sommer T: **Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms.** *Mol Cell* 2010, **40**:238-252.
3. Pickart CM: **Mechanisms underlying ubiquitination.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:503-533.
4. Weissman AM: **Themes and variations on ubiquitylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:169-178.
5. Finley D: **Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.** *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:477-513.
6. Arndt V, Rogon C, Hohfeld J: **To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64**:2525-2541.
7. Jentsch S, Rumpf S: **Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway?** *Trends Biochem Sci* 2007, **32**:6-11.
8. Stolz A, Hilt W, Buchberger A, Wolf DH: **Cdc48: a power machine in protein degradation.** *Trends Biochem Sci* 2011, **36**:515-523.
9. Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM: **Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle.** *Nat Struct Biol* 2002, **9**:950-957.
10. Bukau B, Weissman J, Horwich A: **Molecular chaperones and protein quality control.** *Cell* 2006, **125**:443-451.
11. Rape M, Hoppe T, Gorr I, Kalocay M, Richly H, Jentsch S: **Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone.** *Cell* 2001, **107**:667-677.
12. Dantuma NP, Hoppe T: **Growing sphere of influence: Cdc48/p97 orchestrates ubiquitin-dependent extraction from chromatin.** *Trends Cell Biol* 2012, **22**:483-491.
13. Medicherla B, Kostova Z, Schaefer A, Wolf DH: **A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation.** *EMBO Rep* 2004, **5**:692-697.
14. Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoegge C, Jentsch S: **A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting.** *Cell* 2005, **120**:73-84.
15. Voges D, Zwickl P, Baumeister W: **The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:1015-1068.
16. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T: **The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum.** *Nature* 2009, **458**:453-460.
17. Bays NW, Gardner RG, Seelig LP, Joazeiro CA, Hampton RY: **Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:24-29.

18. Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T: **A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:379-384.
19. Lenk U, Sommer T: **Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39403-39410.
20. Ravid T, Kreft SG, Hochstrasser M: **Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways.** *EMBO J* 2006, **25**:533-543.
21. Chen P, Johnson P, Sommer T, Jentsch S, Hochstrasser M: **Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor.** *Cell* 1993, **74**:357-369.
22. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA: **Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins.** *Cell* 2006, **126**:361-373.
23. Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L, Lemberg MK: **Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins.** *Mol Cell* 2012, **47**:558-569.
24. Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: **ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum.** *Bioessays* 2010, **32**:905-913.
25. Rapoport TA: **Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes.** *Nature* 2007, **450**:663-669.
26. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M: **N-glycan structures: recognition and processing in the ER.** *Trends Biochem Sci* 2010, **35**:74-82.
27. Hebert DN, Foellmer B, Helenius A: **Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum.** *Cell* 1995, **81**:425-433.
28. Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T, Aebi M: **Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum.** *J Cell Biol* 2009, **184**:159-172.
29. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K: **EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin.** *Science* 2003, **299**:1394-1397.
30. Quan EM, Kamiya Y, Kamiya D, Denic V, Weibezahn J, Kato K, Weissman JS: **Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Mol Cell* 2008, **32**:870-877.
31. Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K: **Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans.** *J Biol Chem* 2009, **284**:17061-17068.
32. Bhamidipati A, Denic V, Quan EM, Weissman JS: **Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen.** *Mol Cell* 2005, **19**:741-751.
33. Kim W, Spear ED, Ng DT: **Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation.** *Mol Cell* 2005, **19**:753-764.
34. Gauss R, Kanehara K, Carvalho P, Ng DT, Aebi M: **A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum.** *Mol Cell* 2011, **42**:782-793.

35. Gauss R, Sommer T, Jarosch E: **The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment.** *EMBO J* 2006, **25**:1827-1835.
36. Stanley AM, Carvalho P, Rapoport T: **Recognition of an ERAD-L substrate analyzed by site-specific in vivo photocrosslinking.** *FEBS Lett* 2011, **585**:1281-1286.
37. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P: **Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.** *Cell* 2000, **101**:249-258.
38. Walter P, Ron D: **The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.** *Science* 2011, **334**:1081-1086.
39. Gardner BM, Walter P: **Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response.** *Science* 2011, **333**:1891-1894.
40. Wickner W, Schekman R: **Protein translocation across biological membranes.** *Science* 2005, **310**:1452-1456.
41. Rapoport TA: **Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane.** *FEBS J* 2008, **275**:4471-4478.
42. Flierman D, Ye Y, Dai M, Chau V, Rapoport TA: **Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane.** *J Biol Chem* 2003, **278**:34774-34782.
43. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T: **Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:134-139.
44. Gorlich D, Rapoport TA: **Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane.** *Cell* 1993, **75**:615-630.
45. Rassow J, Hartl FU, Guiard B, Pfanner N, Neupert W: **Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state.** *FEBS Lett* 1990, **275**:190-194.
46. Plath K, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA: **Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**:1-10.
47. Pilon M, Schekman R, Romisch K: **Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation.** *EMBO J* 1997, **16**:4540-4548.
48. Schafer A, Wolf DH: **Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery.** *EMBO J* 2009, **28**:2874-2884.
49. Plemper RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH: **Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation.** *Nature* 1997, **388**:891-895.
50. Bagola K, Mehnert M, Jarosch E, Sommer T: **Protein dislocation from the ER.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1808**:925-936.
51. Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA: **X-ray structure of a protein-conducting channel.** *Nature* 2004, **427**:36-44.
52. Li W, Schulman S, Boyd D, Erlandson K, Beckwith J, Rapoport TA: **The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal.** *Mol Cell* 2007, **26**:511-521.

53. Tirosh B, Furman MH, Tortorella D, Ploegh HL: **Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation.** *J Biol Chem* 2003, **278**:6664-6672.
54. Hitt R, Wolf DH: **Der1p, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins.** *FEMS Yeast Res* 2004, **4**:721-729.
55. Horn SC, Hanna J, Hirsch C, Volkwein C, Schutz A, Heinemann U, Sommer T, Jarosch E: **Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase.** *Mol Cell* 2009, **36**:782-793.
56. Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH: **Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast.** *EMBO J* 1996, **15**:753-763.
57. Taxis C, Hitt R, Park SH, Deak PM, Kostova Z, Wolf DH: **Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD.** *J Biol Chem* 2003, **278**:35903-35913.
58. Vashist S, Ng DT: **Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control.** *J Cell Biol* 2004, **165**:41-52.
59. Goder V, Carvalho P, Rapoport TA: **The ER-associated degradation component Der1p and its homolog Dfm1p are contained in complexes with distinct cofactors of the ATPase Cdc48p.** *FEBS Lett* 2008, **582**:1575-1580.
60. Sato BK, Hampton RY: **Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis.** *Yeast* 2006, **23**:1053-1064.
61. Stolz A, Schweizer RS, Schafer A, Wolf DH: **Dfm1 forms distinct complexes with Cdc48 and the ER ubiquitin ligases and is required for ERAD.** *Traffic* 2010, **11**:1363-1369.
62. Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA: **Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:14132-14138.
63. Lilley BN, Ploegh HL: **Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:14296-14301.
64. Greenblatt EJ, Olzmann JA, Kopito RR: **Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant alpha-1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum.** *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**:1147-1152.
65. Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K: **Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation.** *J Cell Biol* 2006, **172**:383-393.
66. Lilley BN, Ploegh HL: **A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER.** *Nature* 2004, **429**:834-840.
67. Sun F, Zhang R, Gong X, Geng X, Drain PF, Frizzell RA: **Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants.** *J Biol Chem* 2006, **281**:36856-36863.
68. Wahlman J, DeMartino GN, Skach WR, Bulleid NJ, Brodsky JL, Johnson AE: **Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system.** *Cell* 2007, **129**:943-955.
69. Bernardi KM, Forster ML, Lencer WI, Tsai B: **Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:877-884.

70. Deak PM, Wolf DH: **Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:10663-10669.
71. Kreft SG, Wang L, Hochstrasser M: **Membrane topology of the yeast endoplasmic reticulum-localized ubiquitin ligase Doa10 and comparison with its human ortholog TEB4 (MARCH-VI).** *J Biol Chem* 2006, **281**:4646-4653.
72. Sato BK, Schulz D, Do PH, Hampton RY: **Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase.** *Mol Cell* 2009, **34**:212-222.
73. Carvalho P, Stanley AM, Rapoport TA: **Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p.** *Cell* 2010, **143**:579-591.
74. Li W, Tu D, Li L, Wollert T, Ghirlando R, Brunger AT, Ye Y: **Mechanistic insights into active site-associated polyubiquitination by the ubiquitin-conjugating enzyme Ube2g2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:3722-3727.
75. Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Koning F, Kloetzel PM, Seeger M: **The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway.** *J Mol Biol* 2005, **354**:1021-1027.
76. Ploegh HL: **A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum.** *Nature* 2007, **448**:435-438.
77. Martin S, Parton RG: **Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:373-378.
78. Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T: **Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B.** *Mol Biol Cell* 2006, **17**:2674-2683.
79. Fujimoto T, Ohsaki Y: **Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets.** *Autophagy* 2006, **2**:299-301.
80. Suzuki M, Otsuka T, Ohsaki Y, Cheng J, Taniguchi T, Hashimoto H, Taniguchi H, Fujimoto T: **Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**:800-810.
81. Olzmann JA, Kopito RR: **Lipid droplet formation is dispensable for endoplasmic reticulum-associated degradation.** *J Biol Chem* 2011, **286**:27872-27874.
82. Fei W, Wang H, Fu X, Bielby C, Yang H: **Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem J* 2009, **424**:61-67.
83. Neuber O, Jarosch E, Volkwein C, Walter J, Sommer T: **Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:993-998.
84. Schubert C, Buchberger A: **Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation.** *Nat Cell Biol* 2005, **7**:999-1006.
85. Ballar P, Shen Y, Yang H, Fang S: **The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation.** *J Biol Chem* 2006, **281**:35359-35368.

86. Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S: **Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4)chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates.** *EMBO J* 2002, **21**:615-621.
87. Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S: **AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:626-634.
88. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA: **Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains.** *J Cell Biol* 2003, **162**:71-84.
89. Bays NW, Wilhovsky SK, Goradia A, Hodgkiss-Harlow K, Hampton RY: **HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:4114-4128.
90. Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Kruger V, Beck S, Wagner R, Erdmann R: **The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:273-277.
91. Schliebs W, Girzalsky W, Erdmann R: **Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:885-890.
92. Girzalsky W, Saffian D, Erdmann R: **Peroxisomal protein translocation.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1803**:724-731.
93. Platta HW, El Magraoui F, Baumer BE, Schlee D, Girzalsky W, Erdmann R: **Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**:5505-5516.
94. Platta HW, Debelyy MO, El Magraoui F, Erdmann R: **The AAA peroxins Pex1p and Pex6p function as dislocases for the ubiquitinated peroxisomal import receptor Pex5p.** *Biochem Soc Trans* 2008, **36**:99-104.
95. Biederer T, Volkwein C, Sommer T: **Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface.** *Science* 1997, **278**:1806-1809.
96. Chen S, Schultz PG, Brock A: **An improved system for the generation and analysis of mutant proteins containing unnatural amino acids in Saccharomyces cerevisiae.** *J Mol Biol* 2007, **371**:112-122.
97. Biederer T, Volkwein C, Sommer T: **Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway.** *EMBO J* 1996, **15**:2069-2076.
98. Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, Philippsen P, Pringle JR: **Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae.** *Yeast* 1998, **14**:953-961.
99. Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A: **New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in Saccharomyces cerevisiae.** *Yeast* 2005, **22**:1-12.
100. Kim I, Li Y, Muniz P, Rao H: **Usa1 protein facilitates substrate ubiquitylation through two separate domains.** *PLoS One* 2009, **4**:e7604.
101. Carroll SM, Hampton RY: **Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase.** *J Biol Chem* 2010, **285**:5146-5156.

102. Kny M, Standera S, Hartmann-Petersen R, Kloetzel PM, Seeger M: **Herp regulates Hrd1-mediated ubiquitylation in a ubiquitin-like domain-dependent manner.** *J Biol Chem* 2011, **286**:5151-5156.
103. Hanna J, Schutz A, Zimmermann F, Behlke J, Sommer T, Heinemann U: **Structural and biochemical basis of Yos9 protein dimerization and possible contribution to self-association of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation ubiquitin-ligase complex.** *J Biol Chem* 2012, **287**:8633-8640.
104. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, Schultz PG: **An expanded eukaryotic genetic code.** *Science* 2003, **301**:964-967.
105. Dorman G, Prestwich GD: **Benzophenone photophores in biochemistry.** *Biochemistry* 1994, **33**:5661-5673.
106. Caldwell SR, Hill KJ, Cooper AA: **Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi.** *J Biol Chem* 2001, **276**:23296-23303.
107. Taxis C, Vogel F, Wolf DH: **ER-golgi traffic is a prerequisite for efficient ER degradation.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:1806-1818.
108. Wu Z, Yan N, Feng L, Oberstein A, Yan H, Baker RP, Gu L, Jeffrey PD, Urban S, Shi Y: **Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry.** *Nat Struct Mol Biol* 2006, **13**:1084-1091.
109. Wang Y, Zhang Y, Ha Y: **Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease.** *Nature* 2006, **444**:179-180.

Anhang A PCR-Programme

A.1 Programm für Amplifikationen mit dem *Expand High Fidelity PCR System*/Taq DNA-Polymerase

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialdenaturierung	95 °C	4 min	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 35
Hybridisierung	49-53 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min/1,5 kb	
Finale Elongation	72 °C	4 min	1

A.2 Programm für Amplifikationen mit der *Pfu Ultra™ HF* DNA-Polymerase

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialdenaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 16
Hybridisierung	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	1,5 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	8 min	1

Anmerkung: PCR-Programm für die Mutation einer Aminosäure

Anhang B PCR-Ansätze

Taq-PCR	<i>Expand</i>-PCR	<i>Pfu Ultra</i>[™] <i>HF</i>-PCR
1 x <i>Expand</i> -Puffer #2	1 x <i>Expand</i> -Puffer #2	1 x <i>Pfu Ultra</i> [™] <i>HF</i> -Puffer
200 µM dNTPs	200 µM dNTPs	200 µM dNTPs
0,3 µM fw-Oligonukl.	0,3 µM fw-Oligonukl.	250 ng fw-Oligonukl.
0,3 µM rv-Oligonukl.	0,3 µM rv-Oligonukl.	250 ng rv-Oligonukl.
-	-	1,5 % DMSO
50 ng Plasmid-DNA	50 ng Plasmid-DNA	150 ng Plasmid-DNA
5 U DNA-Polymerase	3,5 U DNA-Polymerase	2,5 U DNA-Polymerase
ad 50 µl mit ddH ₂ O	ad 50 µl mit ddH ₂ O	ad 50 µl mit ddH ₂ O

Anmerkung: Oligonukl. = Oligonukleotid

Abkürzungsverzeichnis A Akronyme/Einheiten

Akronyme/Einheiten	Bedeutung
Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
AAA	<i>ATPase Associated with a variety of cellular Activities</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BiP	<i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
Brij58	Polyethylenglykol-hexadecylether
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cdc48	<i>Cell Division Cycle</i>
CHIP	<i>C-terminus of Hsc70-Interacting Protein</i>
CHX	Cycloheximid
CPY	CarboxyPeptidase Y
CPY*	CarboxyPeptidase Y (G255R), fehlgefaltete Form
CUE	<i>Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation</i>
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
Der1	<i>Degradation in the Endoplasmic Reticulum</i>
Derlin	<i>Der1-like protein</i>
Dfm1	<i>Der1-like Family Member</i>
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
Doa10	<i>Suppressor of mrna Stability Mutant, SSM4</i>
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
E4	Ubiquitinketten-Elongationsenzym
ECL	<i>Enhanced ChemoLuminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDEM	<i>ER Degradation-Enhancing alpha-Mannosidase-like protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assozierte Proteindegradation
5-FOA	5-Fluoruracil-4-carbonsäure
µF	Mikro-Farad (elektrische Kapazität)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
fw	<i>forward</i>

Abkürzungsverzeichnis

Akronyme/Einheiten	Bedeutung
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HA	Hämagglutinin
Hac1	<i>Homologous to Atf/Creb1</i>
HECT	<i>Homologous to E6AP Carboxy-Terminus</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HERP	<i>Homocysteine-induced Endoplasmic Reticulum Protein</i>
Hmg2	3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-coenzyme A reductase
Hrd1	<i>HMG-coA Reductase Degradation 1</i>
Hrd3	<i>HMG-coA Reductase Degradation 3</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
Htm1	<i>MaNnosidase-Like protein, Mnl1</i>
IB	Immunoblot
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	1-Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Ire1	<i>Inositol REquiring</i>
Kan	Kanamycin
Kar2	<i>KARyogamy</i>
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 bp)
kD	Kilodalton (1 kDa = 1000 g/mol)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Mat	<i>mating type</i> (Paarungstyp)
MBq	Mega-Becquerel
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NGF	N-Glykosidase F
NHK	<i>Null Hong Kong mutant of α1-antitrypsin</i>
NP40	Nonidet® P40 Substitute
Npl4	<i>Nuclear Protein Localization</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm
pBpa	p-Benzoyl-L-Phenylalanin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pex	<i>PEroXisome related</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrA*	fehlgefaltete Form der Proteinase A (auch Pep4)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Revolutions Per Minute</i>)
Rpn	<i>Proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like</i>
Rpt	<i>Regulatory Particle Triple ATPase</i>
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

Akronyme/Einheiten	Bedeutung
rv	<i>reverse</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic Dropout</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec61	<i>SECretory</i>
Ste6*	<i>STERile</i> , fehlgefaltete Form eines ATP-Bindungskassetten-Transporters
TAE	Tris-Acetate-Puffer mit EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBT	Tris-Puffer mit Tween (<i>Tris buffer with Tween</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin
TIM	<i>Transporter of the Inner Membrane</i>
TM-Domäne	Transmembrandomäne
TOM	<i>Transporter of the Outer Membrane</i>
TPR	<i>TetratricoPeptide Repeat</i> -Motiv
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglykol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat
U	Units (Enzymaktivität)
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>UBiquitin-Associated domain</i>
Ubc	<i>UBiquitin-Conjugating enzyme</i>
UBL	<i>UBiquitin-Like domain</i>
UBX	<i>Ubiquitin regulatory X</i>
Ubx2	<i>UBiquitin regulatory X 2</i>
Ufd1	<i>Ubiquitin Fusion Degradation protein</i>
UGT1	UDP-Glukose-Glykoprotein-Glycosyltransferase
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UP-System	Ubiquitin-Proteasom-System
Usa1	<i>U1-Snp1 Associating</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt (elektrische Spannung)
VBM	<i>VCP-Binding Motif</i>
VCP	<i>Valosin-Containing Protein</i>
VIM	<i>VCP-Interacting Motif</i>
v/v	Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
Yos9	<i>Yeast OS-9 homolog</i>
YPD	<i>Yeast extract, Peptone, Dextrose</i>

Abkürzungsverzeichnis B Aminosäurecode

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: **ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum.**

Bioessays 2010, **32**:905-913.

Bagola K, Mehnert M, Jarosch E, Sommer T: **Protein dislocation from the ER.**

Biochim Biophys Acta 2011, **1808**:925-936.

Posterpräsentationen

Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: **Functional characterization of Der1 and its role in the HRD complex.**

EMBO Conference: Ubiquitin and Ubiquitin-like modifiers in health and disease.

22.-26. September 2009, Riva del Garda, Italien

Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: **Der1 constitutes a component of the ER export channel.**

Cold Spring Harbor Conference: The Ubiquitin Family.

17.-21. Mai 2011, Cold Spring Harbor, USA

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Titel.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Sommer für die Betreuung und freundliche Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken. Herrn Dr. Ernst Jarosch danke ich für die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas und die zahlreichen Anregungen sowie Diskussionen zum Forschungsprojekt.

Ebenso danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sommer für die lockere Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Corinna Volkwein, Mareen Kamarys, Marcel Nowak, Franziska Zimmermann, Sathish Lakshmipathy, Katrin Bagola, Holger Brendebach, Anett Köhler, Maximilian von Delbrück, Annika Weber und Maren Berger für die schöne Zeit im Labor und die stetige Hilfsbereitschaft.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mit ihrer immerwährenden Liebe und Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglichten.